



**KAUNO TECHNOLOGIJOS UNIVERSITETAS
CHEMINĖS TECHNOLOGIJOS FAKULTETAS**

Tomas Andriekus

**KANAPIŲ SĖKLŲ LUKŠTŲ BIOMASĖS
FERMENTAVIMO PROCESO OPTIMIZAVIMAS IR
PRITAIKYMAS ĮVAIRIAIS EKSTRAKCIJOS METODAIS
APDOROTAI ŽALIAVAI**

Baigiamasis magistro projektas

Vadovas

prof. dr. Rimantas Petras Venskutonis

Kaunas, 2017

**KAUNO TECHNOLOGIJOS UNIVERSITETAS
CHEMINĖS TECHNOLOGIJOS FAKULTETAS**

**KANAPIŲ SĖKLŲ LUKŠTŲ BIOMASĖS
FERMENTAVIMO PROCESO OPTIMIZAVIMAS IR
PRITAIKYMAS ĮVAIRIAIS EKSTRAKCIJOS
METODAIS APDOROTAI ŽALIAVAI**

Baigiamasis magistro projektas

Studijų programa Pramoninė biotechnologija (kodas 621J0004)

Vadovas

prof. dr.

Rimantas Petras Venskutonis

Recenzentas

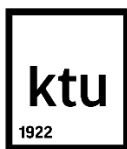
doc. dr.

Kęstutis Rutkauskas

Projektą atliko

Tomas Andriekus

Kaunas, 2017



KAUNO TECHNOLOGIJOS UNIVERSITETAS
CHEMINĖS TECHNOLOGIJOS FAKULTETAS

Tomas Andriekus

Studijų programa Pramoninė biotechnologija (kodas 621J0004)

Baigiamojo darbo „Kanapių sėklų lukštų biomasės fermentavimo proceso optimizavimas ir pritaikymas įvairiais ekstrakcijos metodais apdorotai žaliavai“

AKADEMINIO SAŽININGUMO DEKLARACIJA

2017 m. gegužės mėn. 19 d.

Kaunas

Patvirtinu, kad mano **Tomo Andriekaus** baigiamasis darbas tema „Kanapių sėklų lukštų biomasės fermentavimo proceso optimizavimas ir pritaikymas įvairiais ekstrakcijos metodais apdorotai žaliavai“ yra parašytas visiškai savarankiškai, o visi pateikti duomenys ar tyrimų rezultatai yra teisingi ir gauti sąžiningai. Šiame darbe nei viena darbo dalis nėra plagijuota nuo jokių spausdintinių ar internetinių šaltinių, visos kitų šaltinių tiesioginės ir netiesioginės citatos nurodytos literatūros nuorodose. Įstatymu nenumatytų piniginių sumų už šį darbą niekam nesu mokėjęs.

Aš suprantu, kad išaiškėjus nesąžiningumo faktui, man bus taikomos nuobaudos, remiantis Kauno technologijos universitete galiojančia tvarka.

(studento vardas ir pavardė, įrašyti ranka)

(parašas)

Turinys

SANTRAUKA	6
SUMMARY	8
Santrumpos.....	10
Įvadas	12
1. Literatūros apžvalga.....	14
1.1 Pluoštinės kanapės (<i>Cannabis sativa</i> L.).....	14
1.1.1 Pluoštinių kanapių sandara ir panaudojimas	14
1.1.2 Kanapėse randamų bioaktyvių junginių cheminė sandara	15
1.2 Lignoceliuliozinės žaliavos apdorojimas.....	17
1.2.1 Lignoceliuliozinės žaliavos atliekos.....	17
1.2.2 Lignoceliuliozinės žaliavos apdorojimo būdai.....	18
1.2.3 Fermentai naudojami augalinės žaliavos apdorojimui	21
1.2.4 Fermentavimo tipai	21
1.2.5 DNS metodas redukuojantiems cukrams nustatyti.....	23
1.3 Bioaktyvių medžiagų išgavimas ekstrahavimo metodais	23
1.3.1 Ekstrakcija superkritiniu CO ₂	24
1.3.2 Suspausto skysčio ekstrakcija	26
1.3.3 Skysčio – skysčio ekstrakcija	27
1.3.4 Kietafazė ekstrakcija	27
1.3.5 Ekstrakcija ultragarsu	28
2. Medžiagos ir tyrimų metodai	29
2.1 Tiriamųjų darbų technologinė schema	29
2.2 Pirminis kanapių sėklų lukštų biomasės apdorojimas	30
2.3 Reduojančių cukrų analizė DNS metodu.....	30
2.4 Fermentų mišinio karboksimetilceliuliazinio aktyvumo nustatymas	31
2.5 Ekstrakcija SFE-CO ₂ automatizuotame ekstraktoriuje	32
2.6 Ekstrahavimas suspausto skysčio ekstraktoriumi	33

2.7	Ekstrakcija netiesioginiu ultragarso poveikiu.....	35
2.8	Fermentavimo sąlygų eksperimentinis planavimas	35
2.8.1	Fermentavimo sąlygų optimizavimo planavimas Design-Expert programa	35
2.8.2	Fermentacijų atlikimas pagal sudarytą CKRP	37
2.9	Optimalių fermentavimo sąlygų įvairiai apdorotai biomasei taikymas.....	37
3.	Tyrimų rezultatai ir jų aptarimas.....	39
3.1	Fermentavimo proceso optimizavimas	39
3.2	Kanapių sėklų lukštų ekstraktų išėigos po skirtingų ekstrakcijos apdorojimo procesų .	44
3.3	Optimalių fermentavimo sąlygų pritaikymas kanapių lukštų mėginams apdorotiems skirtingais ekstrakcijos metodais	46
3.4	Optimalių fermentavimo sąlygų pritaikymas įvairiais ekstrakcijos metodais apdorotai grikių sėklų lukštų biomasei	49
4.	Rekomendacijos	51
4.1	Efektyviausio bioaktyvių junginių išgavimo proceso iš kanapių sėklų lukštų aparatūrinė schema	51
5.	Išvados	54
6.	Literatūros sąrašas.....	55
7.	Priedai	58
	Padėkos.....	60

Andriekus, Tomas. Kanapių sėklų lukštų biomasės fermentavimo proceso optimizavimas ir pritaikymas įvairiais ekstrakcijos metodais apdorotai žaliavai. Magistro projektas *Pramoninė biotechnologija* / prof. dr. Rimantas Petras Venskutonis. Kauno technologijos universitetas, Cheminės technologijos fakultetas, Organinės chemijos katedra.

Mokslo kryptis ir sritis: Pramoninė biotechnologija.

Reikšminiai žodžiai: Pluoštinės kanapės, lukštai, ekstrakcija, fermentai.

Kaunas, 2017. 60 psl.

SANTRAUKA

Bioaktyvių junginių išgavimas iš maisto pramonės lignoceliuliozinių atliekų tampa patrauklus dėl pigios žaliavos, nesudėtingos logistikos ir aukštos galutinių produktų pridėtinės vertės. Dažniausiai vertingų junginių išgavimas atliekamas įvairiais ekstrakcijos metodais, o jų ekstraktų mišiniai arba išgryninti komponentai naudojami kosmetikos, farmacijos ir kitose srityse. Kadangi lignoceliuliozės dariniai yra pagrindinės naudojamos žaliavos sudėtinės dalys, tyrėjai vis dažniau, siekdami išgauti didesnius kiekius bioaktyvių medžiagų, naudoja komercinius fermentų mišinius, kurie pasižymi aukštu karbohidratų hidrolizės aktyvumu.

Šio darbo tikslas buvo nustatyti optimalias kanapių sėklų luobelų fermentavimo sąlygas naudojant komercinį fermentų mišinį Viscozyme L (102 KMC IU). Gautos optimalios fermentavimo sąlygos buvo pritaikytos atliekant kanapių sėklų lukštų biomasės fermentinę hidrolizę. Naudotas neapdorotas ir iš anksto apdorotas įvairiomis SFE-CO₂, PLE, UAE ekstrakcijos metodų kombinacijomis kanapių substratas. Sudaryta efektyviausio bioaktyvių junginių išgavimo technologinio proceso aparatūrinė schema.

Optimizavimo planui įvykdyti buvo sudarytas 3 kintamųjų (pH, E/S, ekspozicijos trukmės) centrinis kompozicinis rotabilinis planas (CKRP) su statistinių duomenų apdorojimo programa Design-Expert. Pagal programos sudarytą 20 eksperimentų planą, indai su mėginiais inkubuoti pagal atitinkamai gautas kintamųjų sąlygas ir kratyti orbitaline purtykle išlaikant pastovią 50 °C temperatūrą ir 250 aps/min greitį. Po fermentinių hidrolizių DNS metodu išmatuotos redukuojančių cukrų koncentracijos skystosiose mėginių fazėse, o gauti rezultatai, kaip atsako signalai, suvesti į Design-Expert programą ir analizuoti. Nustatytos optimalios sąlygos: pH=4,54, E/S=6,7, ekspozicijos trukmė – 6 val ir 12 min visada išlaikant 50 °C temperatūra ir 250 aps/min orbitalinės maišyklės greitį. Kanapių sėklų luobelės buvo apdorotos SFE-CO₂, PLE (acetonu, 70% etanoliu, 140 °C vandeniui), UAE (acetonu, 70 % etanoliu, 50 mmol/L natrio citratiniu buferiniu tirpalu) ekstrakcijų metodų kombinacijomis. Nustatyta, kad didžiausia tirpių junginių

išeiga susidaro atliekant kanapių sėklų luobelėlių žaliavos apdorojimą SFE-CO₂ ir vykdant ekstrakciją PLE (acetonu, 70 % etanoliu, 140 °C vandeniui). Gauta suminė išeiga siekė 21,30 %. SFE-CO₂ apdorota kanapių lukštų biomasė taip pat ekstrahuota netiesioginiu UAE (acetone) ir UAE (70 % etanolyje), o toliau atitinkamai PLE (acetonu) ir PLE (70 % etanoliu). Nustatyta, kad šios ekstrakcijų kombinacijos atitinkamai 11,56 % ir 22,50 % pakėlė tirpių junginių išeigas lyginant su išeigomis gautomis po ekstrakcijų atliktų šia seka: žaliava apdorota SFE-CO₂, PLE (acetonu) arba SFE-CO₂, PLE (70 % etanoliu). Kanapių sėklų luobelės iš anksto apdorotos skirtingų ekstrahavimo kombinacijų buvo fermentuotos optimaliomis sąlygomis. Nustatyta, kad fermentacijos atliktos su žaliava po SFE-CO₂ ir PLE (acetonu), PLE (70 % etanoliu), PLE (140 °C vandeniui) padidina nuo 5 iki 8 kartų bioaktyvių junginių išeigas lyginant su tų pačių žaliavų ekstrakcija buferiniu tirpalu išlaikant tas pačias inkubacines sąlygas. Rezultatai atspindi, kad fermentaciją geriausia vykdyti atlikus kuo daugiau papildomų ekstrakcijų, kurių metu išekstrahuojami didesni nepolinių ir polinių junginių kiekiai. Tokiu atveju karbohidratų skaidantiems fermentams lengviau pasiekti ir hidrolizuoti lignoceliuliozinę matricą bei sumažėja galima fermentų inhibicijos tikimybė dėl augalinėje žaliavoje esančių bioaktyvių junginių.

Optimalios fermentavimo sąlygos taip pat buvo pritaikytos įvairiais ekstrakcijos metodais apdorotai grikių lukštų biomasei. Nustatyta, kad fermentavimas komerciniu fermentų mišiniu Viscozyme L daugiau negu 10 kartų padidina tirpių junginių susidarymą skystojoje frakcijoje lyginant su kontroliniais mėginiais, kurie buvo inkubuoti tomis pačiomis sąlygomis, tik be fermentų. Be to, didžiąją dalį grikių lukštų sandaros sudaro poliniai junginiai, nes ekstrahuojant PLE (140 °C vandeniui) gauta ekstrakcijos išeiga siekė $5,77 \pm 0,36$ %, o SFE-CO₂, PLE (acetonu ir 70 % etanoliu) suminė išeiga viršijo šiek tiek daugiau negu 1 %.

Andriekus, Tomas. Optimization of Enzyme-Assisted Extraction Process with Hemp Seed Hurds Biomass and Application with Pretreated Material by Different Extraction Methods. Masters's thesis in *Industrial Biotechnology* / prof. dr. Rimantas Petras Venskutonis. Kaunas University of Technology, Faculty of Chemical Technology, Department of Organic Synthesis.

Research area and field: Industrial Biotechnology.

Keywords: hemp, hurds, extraction, enzymes.

Kaunas, 2017. 60 p.

SUMMARY

Bioactive compounds obtained from lignocellulosic wastes and produced by food industry become attractive in case of cheap material, simple logistics and high value-added products, mostly, valuable compounds collected by different extraction methods, whose extract mixtures or pure compounds are adapted in cosmetics, pharmacy or other fields. Since the raw material is mostly lignocellulose, researchers started using commercial enzyme mixtures, which are characterized by high carbohydrase activity, to get better yields of bioactive molecules.

The aim of this work was to determine optimal fermentation conditions by using commercial enzyme mixture Viscozyme L (102 CMC IU) from hemp seed hurds. Optimal fermentation conditions were used when performing enzyme assisted hydrolysis with the biomass of hemp seed hurds. Non-treated and by different combinations of SFE-CO₂, PLE, UAE extraction methods pretreated hemp substrate was hydrolyzed by enzyme-assisted extraction. The hardware scheme of the most effective technological process of obtaining bioactive compounds was composed.

Three variables (pH, E/S, exposition time) were used to compose Central Composite Rotatable Plan (CCRD) for optimization plan execution with statistical values estimating program Design Expert. Based on 20 experiments plan comprised by the program, bottles with samples were incubated by variable conditions obtained in accordance with the plan. Bottles were shaken with orbital shaker at 250 rpm/min and 50 °C. Reducing sugars were measured by DNS method in liquid phase samples after fermental hydrolysis. Measured response signal values were collected and analyzed using Design Expert program. Optimal conditions were determined: pH=5.54, E/S=6.7, exposition time – 6 hours and 12 minutes using fixed 50 °C temperature and 250 rpm/min velocity of orbital shaker. Hemp seed hurds were pretreated with SFE-CO₂, PLE (acetone, 70 % ethanol, 140 °C water), UAE (acetone, 70 % ethanol, 50 mmol/L sodium citric buffer) different extraction methods combinations. The highest extract yield (21.30 %) of soluble compounds were obtained by SFE-CO₂, PLE (acetone, 70 % ethanol, 140 °C water) extractions

with hemp seed hurds biomass. Also, UAE (acetone) and UAE (70 % ethanol) were used to treat SFE-CO₂ pretreated hemp seed hurds material which after UAE were respectively extracted by PLE (acetone) and PLE (70 % ethanol). It was determined that mentioned sequence of extraction combination raised extraction yields of soluble compounds by 11.56 % and 22.50 % respectively comparing with extraction sequences: SFE-CO₂, PLE (acetone) or SFE-CO₂, PLE (70 % ethanol). Pretreated hemp seed hurds by different extraction combinations were fermented by optimal conditions. It was determined that fermentation with SFE-CO₂, PLE (acetone), PLE (70 % ethanol), PLE (140 °C water) pretreated material increases bioactive compound yields from 5 to 8 times comparing with the same material extracted by buffer maintaining the same incubation conditions. Results show that fermentation works best with material, which was pretreated with more additional extractions when higher polar and non-polar compounds were extracted. In this case, the enzymes, which decompose carbohydrates, can reach and hydrolyze lignocellulosic matrix better. In addition, inhibition possibility of bioactive compounds inside the vegetal material decreases.

Optimal fermentation conditions were adapted with buckwheat hurds pretreated by different extraction methods. It was determined that fermentation using commercial enzyme mixture Viscozyme L increases soluble compounds in liquid phase more than 10 times comparing with control samples which were incubated using the same conditions but without enzymes. It was also determined that the majority of buckwheat hurds consists of polar compounds, because extraction yield obtained by PLE (140 °C water) was 5.77 ± 0.36 % while extraction yield obtained by the combination of SFE-CO₂, PLE (acetone) and PLE (70 % ethanol) was just above 1 %.

Santrumpos

AIDS – įgytasis imuninio nepakankamumo sindromas;
CAZy – karbohidratų hidrolizuojančių fermentų duomenų bazė;
CBC – kanabichromenas;
CBCA – kanabichromeno rūgštis;
CBD – kanabidiolis;
CBDA – kanabidiolio rūgštis;
CBE – kanabielsono rūgštis;
CBG – kanabigerolis;
CBL – kanabiciklolis;
CBN – kanabinolis;
CBNA – kanabinolis rūgštis;
CBND – kanabinodiolis;
CBT – kanabitriolis;
CKRP – centrinis kompozicinis rotabilinis planas;
DNR – deoksiribonukleorūgštys;
DNS – 3,5-dinitrosalicilinė rūgštis;
E/S – fermento/substrato santykis;
IU (angl. International Units) – tarptautiniai fermentinio aktyvumo vienetai;
KMC – karboksimetilceliuliozė;
LLE – skysčio – skysčio ekstrakcija;
MR – megarentgenai;
P – dispersijų santykio paklaida;
Pkr – kritinis slėgis;
PLE – suslėgto skysčio ekstrakcija;
R2 – determinacijos koeficientas;
RC – redukuoti cukrūs;
SFE – superkritinio skysčio ekstrakcija;
SFE-CO2 – ekstrakcija superkritiniu anglies dvideginiu;
SPE – Kietafazė ekstrakcija;
THCA – tetrahidrokanabinolio rūgštis;
Tkr – kritinė temperatūra;
UAE – ultragarso ekstrakcija;
w/w – masės/masės santykis;

ŽIV – žmogaus imunodeficitas;

Δ 8-THC – trans – Δ 8 izomero tetrahidrokanabinolis;

Δ 9-THC – trans - Δ 9 izomero tetrahidrokanabinolis.

Ivadas

Biotechnologija yra technologija, skirta gyvųjų mikroorganizmų arba jų bioproduktų pritaikymui medicinoje, farmacijoje, maisto ir lengvojoje pramonėje bei kitose veiklos srityse. Bioproduktai išgaunami iš mikroorganizmų, kuriuose atliktos atitinkamos DNR modifikacijos, priverčiančios mikroorganizmus gaminti tikslinį produktą (pavyzdžiui specifinius baltymus, fermentus). Pramoninė biotechnologija arba kitaip baltoji biotechnologija yra sritis, kurioje yra pasiekiamas mikroorganizmų arba jų produktų (dažniausiai fermentų) panaudojimas dideliu kiekiu, t. y. tonomis ir kubiniais metrais. Baltoji biotechnologija taip pat glaudžiai susijusi su maisto mokslu, nes iškyla problema, kaip tikslingai panaudoti maisto pramonės atliekas, kad būtų išgauta papildomų aukštos pridėtinės vertės produktų.

Šiame darbe pasirinkta naudoti komercinį fermentų mišinį Viscozyme L, siekiant išsiaiškinti celiuliazinių fermentų hidrolizės poveikį skaidant lignoceliuliozinę kanapių sėklų lukštų biomasę prieš ir po superkrizinės ekstrakcijos skystu anglies dioksidu (SFE-CO₂) bei po PLE ekstrakcijų skirtingo poliškumo suslėgtais tirpikliais, kaip acetonu, 70 % etanoliumi, vandeniui (140 °C) bei UAE (acetonu, 70 % etanoliumi, 50 mmol/L natrio citratiniu buferiniu tirpalu). Superkrizinis anglies dioksidas padeda lengvai išskirti nepolinius junginius, o acetonas, etanolis ir vanduo, nuosekliai pagal junginių poliškumo didėjimą, vis stipresniu poliškumu pasižyminčius bioaktyvius junginius. Taip pat yra numatyta atlikti tyrimus su kanapių biomase, kuri yra papildomai apdorojama ultragarso bangomis. Šių bangų skleidžiama energija pasižymi ląstelių sienelės ardančiomis savybėmis, ko pasekoje galima atpalaiduoti augalinės biomasės ląsteles ir bioaktyvius komponentus iš augalinei žaliavai būdingos lignoceliuliozinės struktūros. Darbu pasirinktas fermentų mišinys, kuris pasižymi išskirtinai dideliu KMC IU (angl. Carboxymethyl Cellulase) aktyvumu. Fermentai, turintys aukštą minėtą fermentinį aktyvumą, užtikrina karbohidratinę ryšių skaidymą ir įvairių cukrų išgavimą iš netirpios lignoceliuliozinės biomasės, kurie toliau gali būti pritaikomi naudoti bakterijų, mikromicetų ir kitų mikroorganizmų kultivavimui, kaip mitybinė terpė. Taip pat iš skystosios frakcijos įmanoma išskirti įvairių oligosacharidų mišinių, kurie priklausomai nuo koncentracijos pasižymi gydomosiomis savybėmis (mažina cholesterolio, cukraus kiekį kraujyje) ir sustiprina nusilpusį imunitetą. Oligosacharidai sustiprina imunoatsaką, kuris padeda naikinti vėžines ląsteles. Iš ekstrahuoti fenoliniai junginiai naudojami širdies, kraujagyslių ligų ir eilei kitų sveikatos sutrikimų gydymui.

Tiriamąjį darbo tikslas yra nustatyti optimalias fermentavimo sąlygas su niekuo neapdorota kanapių sėklų lukštų biomase bei pritaikyti fermentavimo sąlygas iš anksto skirtingais būdais apdorotiems kanapių sėklų lukštų mėginiais, t. y. apdorotiems superkrizine ekstrakcija CO₂ (SFE-CO₂), netiesiogine ultragarso ekstrakcija (UAE) acetonu, 70 % etanoliumi ir

50 mmol/L koncentracijos natrio citratinu buferiniu tirpalu bei suspausto slėgio ekstrakcija (PLE) acetonu, 70 % etanoliu, 140 °C vandeni. Taip pat, sudaryti efektyviausio bioaktyvių junginių išgavimo technologinio proceso aparatūrinę schemą. Tikslams pasiekti keliami šie uždaviniai:

- atlikti kanapių sėklų lukštų fermentavimo proceso optimizavimą su Viscozyme L komerciniu fermentų mišiniu pagal sudarytą 3 kintamųjų (pH, E/S, ekspozicijos trukmės) centrinę kompozicinę rotabilinį planą (CKRP), kuriame atsako signalu pasirenkama redukuotų cukrų koncentracija;
- atlikti įvairias ekstrakcijas su kanapių sėklų lukštais taikant SFE-CO₂, PLE ir UAE ekstrahavimo metodus;
- pritaikyti optimalias fermentavimo sąlygas su įvairiais ekstrakcijos metodais apdorota žaliava;
- išmatuoti redukuojančių cukrų koncentracijas skystosiose fazėse, gautose po kanapių lukštų fermentavimo procesų, ir apskaičiuoti jų procentinius kiekius išgavose;
- gautas optimalias fermentavimo sąlygas pritaikyti įvairiais ekstrakcijos metodais apdorotiems grikių lukštams;
- nustatyti efektyviausią bioaktyvių junginių išgavimo technologinę seką ir pagal ją nubraižyti rekomenduojamą gamybinę aparatūrinę schemą.

1. Literatūros apžvalga

1.1 Pluoštinės kanapės (*Cannabis sativa* L.)

1.1.1 Pluoštinių kanapių sandara ir panaudojimas

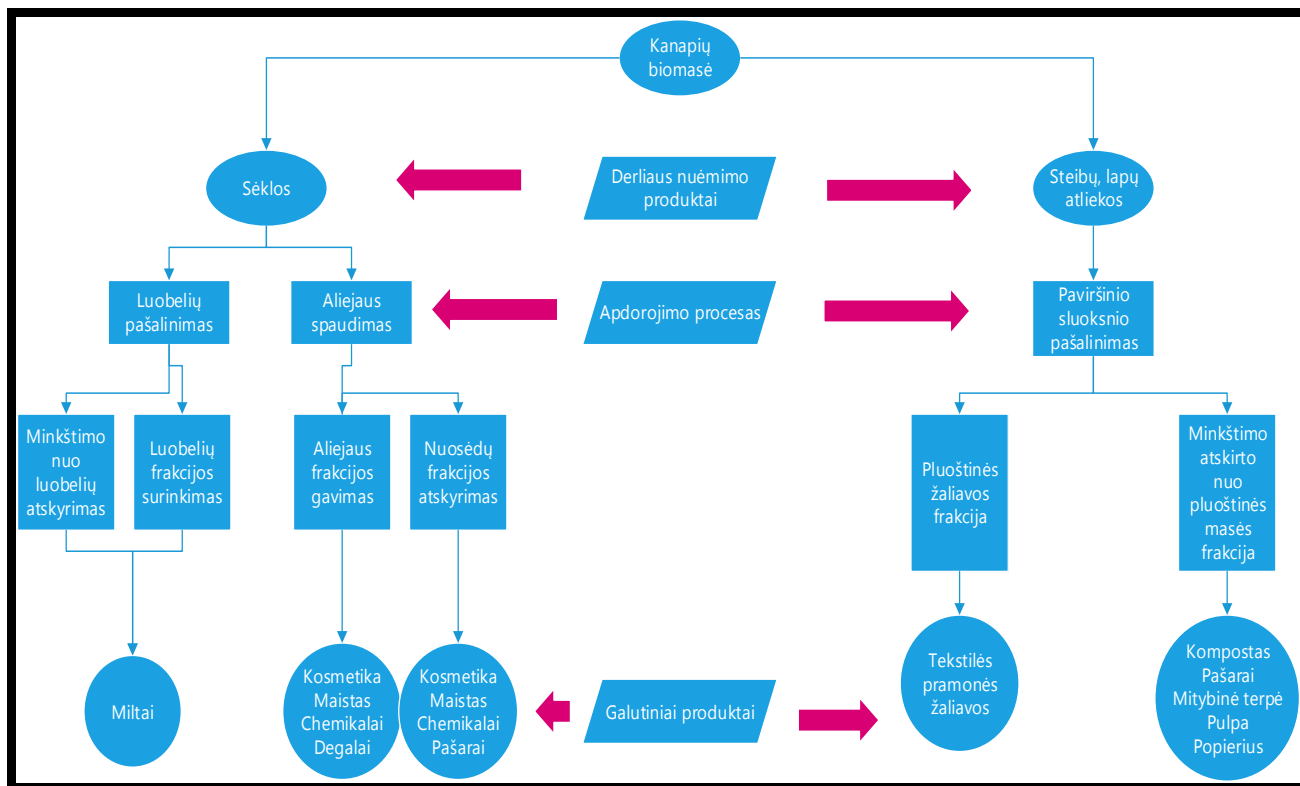
Pramonės sektoriuje naudojamos kanapės priklauso *Cannabaceae* [1] šeimai, *Cannabis* genčiai ir *sativa* rūšiai. Augalas – diploidinis, t. y. gamtoje [2] vyrauja moteriškoji ir vyriškoji lytis. Pluoštinių kanapių morfologija (žr. 1.1 pav.) nesiskiria nuo įprastinių žolinių augalų. Užaugti gali nuo 1 m iki 6 m aukščio. Tai priklauso nuo kultivavimo, aplinkos ir agronominių sąlygų.



1.1 paveikslas. *Cannabis sativa* L. (<https://gobotany.newenglandwild.org/species/cannabis/sativa/>)

Pramonės sektoriuje kanapės vertinamos dėl gerų pluoštinių, kompozicinių savybių, vertingos maistinės žaliavos ir gydomųjų savybių. Medicinoje kanapių bioproduktais [3] gydomas apetito sutrikimas, anoreksija, vėžys, ŽIV, AIDS, chroninis skausmas, reumatoidinis artritas, epilepsija, Alzheimerio liga, Huntingtono liga, diabetas. Kanapių sėklų aliejus naudojamas maisto ir kosmetikos produktų gamyboje. Galima daryti prielaidą, kad pramoniniu būdu auginamos kanapės yra visapusiškai panaudojamos vertingiems buities, maisto, kosmetikos ir farmacijos produktams gaminti.

Gamybinio proceso [2] metu (žr. 1.2 pav.) kanapių augalo dalys yra suskirstomos į stiebų ir sėklų frakcijas. Pagrindiniai tarpiniai produktai išgaunami iš kanapių biomasės yra ligninas, aliejus, cukrūs ir pulpa. Iš tarpinių produktų gaunami galutiniai produktai.



1.2 paveikslas. Pramoninis kanapių sėklų ir stiebų perdirbimo procesas.

1.1.2 Kanapėse randamų bioaktyvių junginių cheminė sandara

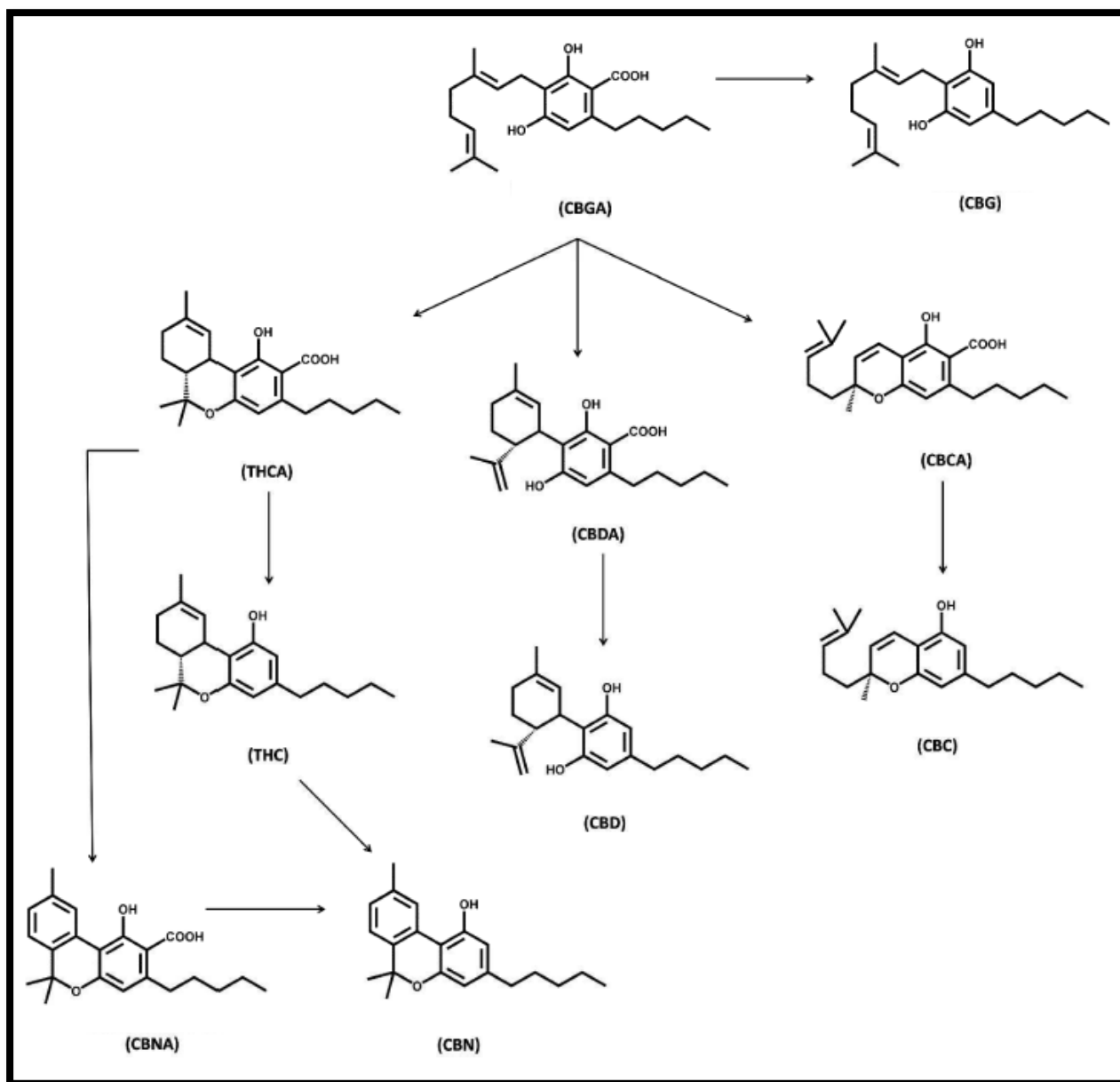
Šiuo metu žinomi ne mažiau, kaip 545 (žr. 1.1 lent.) identifikuoti cheminiai junginiai [4] *C. sativa* L.

1.1 lentelė. Identifikuoti cheminiai junginiai *C. sativa* L. augaluose.

Cheminė klasė	Junginių skaičius
Δ^9 -THC tipo	18
Δ^8 -THC tipo	2
CBG tipo	17
CBC tipo	8
CBD tipo	8
CBND tipo	2
CBE tipo	5
CBL tipo	3
CBN tipo	10

CBT tipo	9
Įvairių tipų	22
Bendras kanabinoidų skaičius	104
Bendras ne kanabinoidų skaičius	441
Bendras junginių skaičius	545

iš kurių net 104 yra kanabinoidai ir 120 terpenai. Kanabinoidai [3] yra sintetinami, kaip hidrofobinių savybių turintys junginiai, pvz.: aromatinės (žr. 1.3 pav.) karboksirūgštys. Šviežiuose

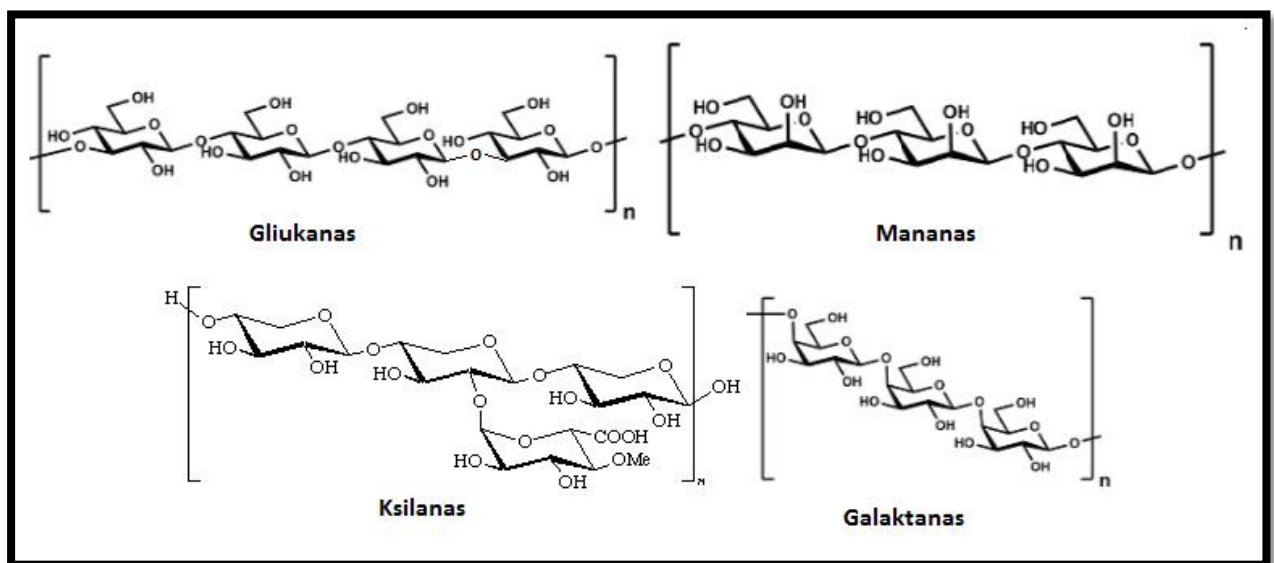


1.3 paveikslas. Kanabinoidų biocheminiai virsmai kanapių augimo metu.

augaluose beveik nėra randama neutralių kanabinoidų, bet kitu atveju kanabinoidus galima paversti į jų neutralius kanabinoidus stiprios šviesos arba karščio poveikiu. Tuo metu vyksta

spontaninė dekarboksilacija. Be to, kanabinoidai, kaip tetrahydrokanabinolis (THC) gali būti oksiduojamas iki kanabinolio (CNB). Pirmasis tarpinis produktas susidaręs oksiduojant THC yra kanabigerolinė rūgštis (CBGA). Toliau vykstant oksidacijai šis junginys transformuojamas iki tetrahydrokanabinolinės rūgšties (THCA), kanabidiolinės rūgšties (CBDA) ir kanabichromeninės rūgšties (CBCA). Monoterpenai ir seskviterpenai kanapėse susintetinami taikant adicijos reakcijas prijungiant geranilo (C₁₀H₁₆) ir farnesilo (C₁₅H₂₄) junginius.

Paminėtina tai, kad kanapės savo ląstelių struktūroje turi nemažai sukaupusios įvairių sacharidų [5, 6]: gliukozės, ksilozės, galaktozės, manozės ir arabinozės. Cukrūs didžiaja dalimi yra ląstelių sienelių sudėtinė dalis. Be to, kanapių sėklų luobelėse yra randami polisacharidai [7] galaktanas (žr. 1.4 pav.), gliukanas, ksilanas ir oligosacharidas mananas.



1.4 paveikslas. Polisacharidai randami kanapių luobelėse.

Šie polisacharidai sudaro apie 50 % sausosios kanapių sėklų lukštų masės ir grynu pavidalu pasižymi geromis imunitetą stiprinančiomis savybėmis. Labai didelis polisacharidų poveikis jaučiamas mažinant gliukozės, cholesterolio kiekį kraujyje, stiprinant kraujagyslių sistemą.

1.2 Lignoceliuliozinės žaliavos apdorojimas

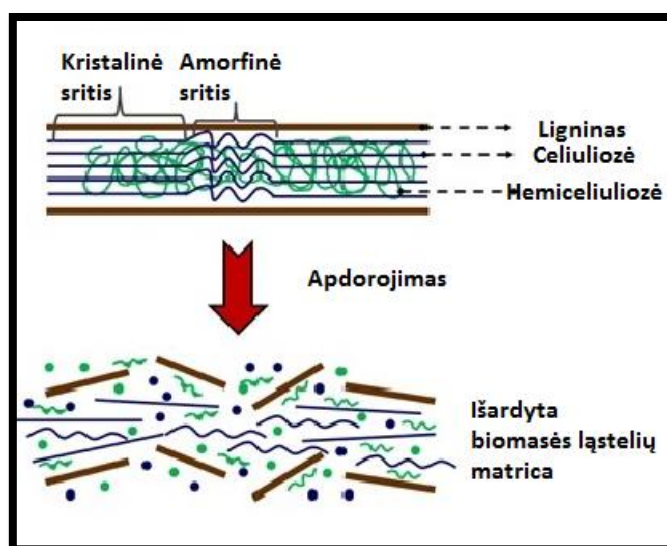
1.2.1 Lignoceliuliozinės žaliavos atliekos

Lignoceliuliozinių atliekų susidarymas yra neatsiejamas žmonių veiklos rezultatas. Šios atliekos [8] susidaro iš gamybos, miškininkystės, žemės ūkio produktų gamybos ir perdirbimo įmonių bei miestų vandenvalos įrenginių. Atliekų susikaupimas specialiuose sąvartynuose neišsprendžia gamtinių, visuomenės ir sveikatos problemų, o jas tiesiog nukelia tolimesniam

laikotarpiui. Todėl būtina ieškoti racionalių būdų, kaip lignoceliuliozinių žaliavų atliekas perdirbti energijos išgavimui dujinio, skysto ar kieto kuro pavidalu bei vertingiems bioaktyviems junginiams, kurie taip pat sukuria aukštą produkto pridėtinę vertę. Šie junginiai priklausomai, kokia tai maistinė žaliava ir kokių savybių turi, gali būti pritaikomi maisto, kosmetikos ar vaistų gamybos pramonėje. Daugiausia iš lignoceliuliozinių atliekų yra išgaunami ekstraktai, kurie būna ypač praturtinti polifenoliniais junginiais, terpenais, vertingomis riebalų rūgštimis ir baltymais. Kadangi lignoceliuliozinė medžiaga yra labai tvirtos matricos, atsiranda siekis ieškoti optimalių žaliavos apdorojimo būdų, kurie leistų lengviau ir didesnėmis išėigomis išgauti vertingus junginius.

1.2.2 Lignoceliuliozinės žaliavos apdorojimo būdai

Lignoceliuliozinės žaliavos apdorojimo procesai gali būti išskirstyti į tris stambias grupes iš kurių išskiriamos po keleta specifiskesnių apdorojimo grupių. Šios grupės pagal kontaktavimo su medžiaga sąlytį skirstomos į dar specifiskesnius apdorojimo būdus. Taigi, pagrindiniai lignoceliuliozės apdorojimo būdai [9, 10, 11] yra fizikinis, cheminis (fizikocheminis) ir biologinis. Priklausomai nuo apdorojamos medžiagos savybių yra pasirenkamas optimalus procesas. Procesų metu įvyksta dalinis arba visiškasis lignino struktūros ardymas ir angliavandenių hidrolizė (žr. 1.5 pav.), t. y. atpalaiduojama biomasės lignoceliuliozinė



1.5 paveikslas.. Augalinės žaliavos matricos suardymas apdorojimo metu
(<http://www.rpi.edu/dept/chem-eng/enzymes/mauricio%20research2.jpg>)

matrica. Būtina pasirinkti tokį apdorojimo metodą, kad būtų pakankamai padidintas medžiagos paviršiaus plotas, maksimaliai atpalaiduoti norimi išgauti komponentai bei užtikrinamas žemas proceso taršos lygis bei energijos sąnaudos.

Fizikinis (9, 10) žaliavos apdorojimo procesas skirstomas į:

- malimą (stikliniais arba metaliniais rutuliukais, dviem volais, plaktukais, diskais, sietais);
- radiacijos poveikį (gama spinduliais, elektronų apšaudymu, mikrobangų, ultragarso);
- kitus poveikius (hidroterminiu, aukšto slėgio garu, sprogdinimu, ekstruzija, pirolize).

Malimas yra pats paprasčiausias lignoceliuliozinės žaliavos apdorojimo būdas, kuris pakankamai padidina medžiagos paviršiaus plotą, kad tolesnio apdorojimo metu (hidrolizės fermentais, ekstrakcijos ar pan.) būtų išgaunamas kuo didesnis kiekis produkto. Malimas gali būti taikomas tiek sausai, tiek drėgnai žaliai. Dėl proceso paprastumo, galima jį kombinuoti kartu su kitais apdorojimo būdais, pvz.: apdorojimu praskiestu rūgšties arba šarmo tirpalu. Be to, rekomenduojama malimą drėgną žaliavą taip pat apdoroti fermentais. Tai leidžia sutaupyti energijos išteklių, o vieno proceso metu net atlikti pirminį apdorojimą (malimą) ir antrinį (hidrolizę).

Gama spinduliai, mikrobangų spinduliai ir apšaudymas elektronais [9, 10, 11] taip pat gali pagerinti fermentinę lignoceliuliozės hidrolizę. Radiacijos poveikio metu žaliai padaugėja gliukozės molekulių. Dėl šios priežasties galima teigti, jog vyksta polisacharidų hidrolizė. Radiacijos pritaikomumas industriniu lygiu nėra išvystytas, todėl dažniausiai šis procesas naudojamas laboratorijose siekiant aiškintis tam tikrų molekulių virsmus proceso metu. Pavyzdžiui, dideliame, t. y. daugiau nei 100 megarentgenų (MR) aplinkoje, įvyksta oligosacharidų [10] ir gliukozės žiedo konstrukcijos pakitimai. Šie kitimai suteikia atskiriems junginiams ar jų polimerams kitokias nei įprasta fizikines ir chemines savybes.

Ultragarso [13] lignoceliuliozinės žaliavos apdorojimas naudojamas dažniausiai augalinei žaliai valyti. Jo poveikis puikiai pašalina prilipusius nešvarumus. Taip pat kavitacijos procesas leidžia efektyviai sunaikinti prie augalų prisitvirtinusius mikroorganizmus. Pagrindiniai faktoriai lemiantys kokybiškai atliekamą procesą yra ultragarso tankis, intensyvumas, aplinkos pH, temperatūra ir veikiamų dalelių koncentracija. Stiprus ultragarso poveikis gali būti naudojamas ir augalo ląstelių ardymui. Augalų ląstelėse dėl kavitacijos reiškinio susidaro oro pūslelės, kurioms daugėjant įvyksta ląstelių sprogdimas. Tokiu būdu lengvai atpalaiduojami ląstelėse esantys bioaktyvūs junginiai.

Cheminis arba fizikocheminis apdorojimas [9, 10, 11, 12, 14] gali būti atliekamas šiais metodais:

- sprogdinimu (garu, amoniaku, CO₂, SO₂);
- šarminio tirpalo poveikiu (natrio hidroksido, amoniako, amonio sulfito);
- rūgšties tirpalo (sieros rūgšties, hidrochlorido rūgšties, fosforo rūgšties);
- dujų (chloro dioksido, azoto dioksido, sieros dioksido);

- oksiduojančių agentų (vandenilio, peroksido, drėgnos oksidacijos, ozono);
- lignino ekstrakcija tirpikliais (etanolio – vandens, benzeno – vandens, etileno glikolio, butanolio vandens, brinkinimo agentais).

Augalinių žaliavų atliekų apdorojimas garo sprogdinimu yra bene dažniausiai naudojamas procesas pramonėje dėl technologinio proceso paprastumo ir vidutinių energijos sąnaudų. Sprogdinimo principas paremtas aukštos temperatūros 160 – 260 °C, o kartu ir slėgio sudarymu sandariai uždarytame reaktoriuje su biomasės įkrova ir greitu slėgio sumažinimu, ko pasekoje susidaro staigi žaliavą sprogdinanti dekompresija. Siekiant padidinti redukuojančių cukrų išėigą, kuri yra pagrindinis lignoceliuliozinės žaliavos apdorojimo įvertinimo rodiklis, apdorojama žaliava garo sprogdinimu su papildomomis modifikacijomis. Sprogdinimas yra atliekamas įvairių koncentracijų SO₂, CO₂, amoniako aplinkoje.

Cheminis apdorojimas šarmų ar rūgščių aplinkoje padeda efektyviai atskirti ligniną. Siekiant pasiekti optimalias laiko ir maksimalaus apdorojimo efektyvumo sąlygas, proceso metu yra varijuojama rūgšties arba šarmo koncentracija ir poveikio trukmė. Koncentracija tiek rūgščių, tiek šarmų svyruoja nuo 3 iki 72 %. Apdorojimo laikas nuo 2 iki 24 valandų. Daugiausiai pramonėje naudojama praskiestų šarmų ir praskiestų rūgščių hidrolizė, t. y. tirpalo koncentracija siekia apie 3%.

Drėgnas oksidavimas, kaip ir sprogdinimas vandens garais, yra efektyvus augalinės žaliavos apdorojimo būdas. Medžiaga yra panardinama į vandens rezervuarą, kuriame yra pasiekiamą 120 °C temperatūra. Vyksta lignoceliuliozės oksidavimas vandens ir garų aplinkoje. Procesas, kuris vykdomas 30 min, yra egzoterminis, todėl inicijavus reakciją, šiluma palaikoma ir paties proceso. Be to, pasibaigus apdorojimui galima lengvai atskirti ligniną ir hemiceliuliozę iš reakcijos mišinio. Dėl šių svarbių savybių sumažėja energijos nuostoliai, padidėja proceso efektyvumas ir drėgnas oksidavimas tampa labai patraukliu pramonės įmonėms.

Lignoceliuliozinės žaliavos gali būti apdorotos biologiškai, t. y. naudojant mikromicetus arba aktinomicetus. Naudojami celiuliazės išskiriantys mikroorganizmai. Šis procesas gali būti naudojamas, kaip ir bioaktyvaus produkto gamyba, nes modifikavus mikroorganizmus galima išgauti tikslius bioaktyvius junginius. Tokiu atveju augalinė žaliava taptų mitybinė terpė.

Visi anksčiau paminėti ir kai kurie svarbesni plačiau apibūdinti lignoceliuliozės medžiagos apdorojimo procesai padeda padidinti paviršiaus plotą, pusiau arba visiškai atlikti ligninino struktūros ardymą, sumažinti celiuliozės kristališkumą, sumažinti gebėjimą polimerizuotis, iš dalies arba visiškai įvykdyti hemiceliuliozių hidrolizę.

1.2.3 Fermentai naudojami augalinės žaliavos apdorojimui

Atsižvelgiant į ekstremaliai sudėtingą lignoceliuliozinės žaliavos apdorojimą, visada buvo manoma, kad termocheminiai procesai yra aktyvesni negu biomasės ląstelių matricos ardymas fermentais. Nepaisant to, biorafinavimo procesai dabar aktyviai plėtojami, todėl šiuo metu yra prieinama didelė gausa komercinių fermentų [15, 16, 17, 18] mišinių, kurie gali hidrolizuoti didelę dalį tiek iš anksto apdorotos, tiek neapdorotos biomasės. Norėdami atlikti efektyvų celiuliozės depolimerizavimą, būtina užtikrinti, kad fermentų mišiniai turi pasižymėti aukštu endo-gliukanaziniu, celobiohidrolaziniu ir gliukozidaziniu aktyvumu. Visi šie fermentų aktyvumai yra glikozilhidrolazių kilmės, t. y. fermentų, kurie hidrolizuoja glikozilinius ryšius. Šie fermentai apibūdinami ir klasifikuojami sistemoje, žinomoje, kaip CAZy, kuri klasifikuoja glikozilhidrolazes į šeimas, priklausomai nuo aminorūgščių sekos ir 3D erdvinės struktūros. Priklausomai iš kokio mikroorganizmo yra pagaminti fermentai, specifinis aktyvumas gali svyruoti, t. y. vienas fermentų mišinys gali turėti stiprų endo-gliukanazinį aktyvumą, o kitas celobiohidrolazinį.

1.2.4 Fermentavimo tipai

Bioaktyvių junginių atpalaidavimui iš lignoceliuliozinės [19] biomasės vis dažniau yra taikomi fermentacijos procesai. Pagal fermentavimo procesą ir skirtingus fazių kontaktavimo principus yra išskiriami keli tipai (žr. 1.2 lent.). Fermentavimas gali būti atliekamas tiek naudojant mikroorganizmus, kurie dauginamiesi biomasės aplinkoje išskiria celiuliozę hidrolizuojančius fermentus, tiek naudojant grynus komercinius fermentų mišinius.

1.2 lentelė. Fermentavimo procesų tipai.

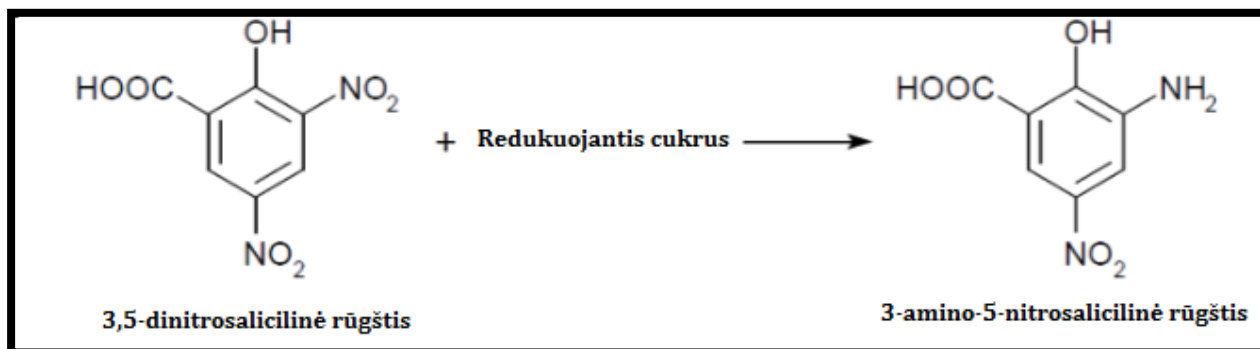
Fermentavimo tipas	Apibūdinimas	Taikymo galimybės
Homogeninis	Fermentacija vyksta skystoje mitybinėje terpėje, kurioje suvartojami ir šalinami medžiagų apykaitos produktai yra tirpūs. Metodas paprastas, galima skysčių, jų pH ir maistinės sudėties reguliavimas fermentacijos metu.	Daugiausiai gamyboje taikomas procesas gaminant įvairius bioaktyvius junginius, kaip specifinių savybių turinčius fermentus, antibiotikus, maistines rūgštis.
Su pamaitinimu (<i>angl.</i>	Procesas toks pats, kaip ir	Mielių, antibiotikų gamyba ir

„Fed-batch“)	homogeninės fermentacijos, pan. tik palaipsniui yra atliekamas kultivuojamos mikroorganizmų kultūros pamaitinimas.	
Nepertraukiamo veikimo	Procesas toks pats, kaip ir homogeninės fermentacijos, tik nuolatos vyksta produktų ir medžiagų apykaitos atliekų šalinimas ir maistinių žaliavų tiekimas. Proceso metu sunku išlaikyti aseptines sąlygas.	Šis fermentacijos procesas taikomas, kuomet yra atliekama fermentacija dideliais kiekiais, t. y. vandenvalos įrenginiuose ir baltymų pašarams gamyboje.
Plėvelinė arba paviršinė	Ši fermentacija atliekama esant dviem skirtingoms fazėms. Toks fermentacijos procesas naudojamas su specifinėmis kultūromis, nes patys mikroorganizmai negali atlikti fermentavimo proceso neprisitvirtinę prie kietosios fazės.	Auginamos gyvūnų ląstelės, valomi nutekamieji vandenys, gaminama acto r.
Kietafazė	Labai paprastas fermentavimo metodas, kuomet fermentacija vyksta esant tik kontaktui su kieta medžiaga oro aplinkoje.	Šis procesas naudojamas kompostavimui, kamieninių organizmų išsaugojimui, genetiniams tyrinėjimams.

Atlikus fermentacijos procesus toliau seka medžiagų, perėjusių į skystą fazę, koncentravimas ir gryninimas. Visų pirma reikia atskirti kietąją frakciją nuo skystosios. Šiam procesui atlikti gali būti naudojamas centrifugavimas ir dekantavimas arba filtravimas su būgniniu filtru, presiniu arba linijino vakuuminio veikimo filtru. Junginių išskirstymas į frakcijas gali būti atliekamas pritaikant mikrofiltravimą arba ultrafiltravimą. Be abejo, susidariusią skystąją frakciją galima liofilizuoti, o po to atlikti chromatografinį išskirstymą.

1.2.5 DNS metodas redukuojantiems cukrams nustatyti

Redukuojančių cukrų analizės metodas yra skirtas nustatyti laisvų karbonilinių grupių būvimą analizuojamoje medžiagoje. Tai yra vienas patikimiausių ir daugiausiai praktikoje taikomas metodas [20, 21] redukuojančių cukrų nustatymui. Metodas labai dažnai atliekamas celiuliozės hidrolizės fermentacijos efektyvumui įvertinti, kuomet reakcijos mišinyje susidaro cukrūs, turintys karbonilines grupes. Reakcijos metu vyksta oksidacija, kuomet gliukozės aldehido funkcinė grupė arba fruktozės keto funkcinė grupė yra oksiduojama.



1.6 paveikslas. 3,5-dinitrosalicilo rūgšties redukcija.

Dėl šios priežasties, tuo pačiu metu vyksta 3,5-dinitrosalicilinės rūgšties (žr. 1.6 pav.) redukcija iki 3-amino-5-nitrosalicilinės rūgšties. Redukuojantis cukrus su 3,5-dinitrosaliciline rūgštimi reaguoja santykiu 1:1. Reakcija vyksta tik šarminėje aplinkoje. Be to, kad ištirpęs deguonis, DNS reagento ir mėginio mišinyje gali įtakoti gliukozės oksidaciją, į mišinį yra pridedama sulfito.

Taigi, DNS metodas redukuojantiems cukrams nustatyti yra vienas patikimiausių ir geriausiai atsikartojantis metodas.

1.3 Bioaktyvių medžiagų išgavimas ekstrahavimo metodais

Darant skirtingų ekstrahavimo metodų apžvalgą galima pastebėti, kad literatūroje jų nurodyta daugybė tipų su įvairiomis modifikacijomis. Šis faktas atspindi, kad kiekvienai augalinei medžiagai turi būti pritaikyti būtent jai optimalūs ekstrakcijos [13] metodai, t. y. būtina išsirinkti efektyviausius ekstrakcijos metodus ir atlikti metodų optimizavimą, siekiant išgauti kuo maksimalesnius ekstraktų kiekius.

Dažniausiai naudojami ekstrahavimo metodai:

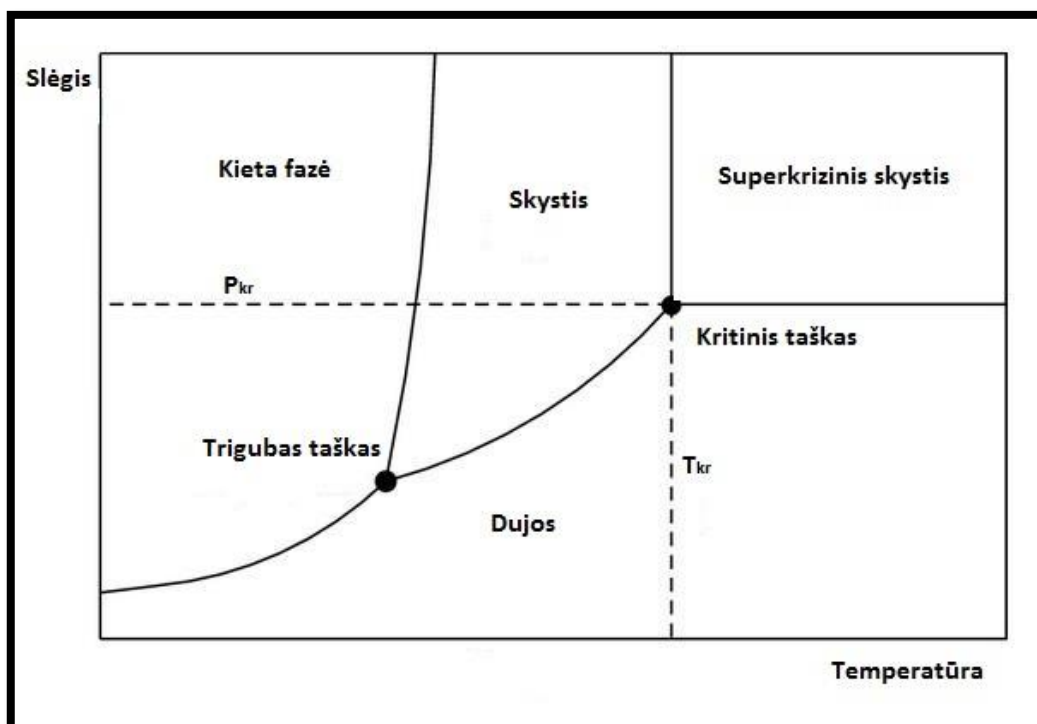
- Ekstrakcija superkritiniu skysčiu (SFE);
- Suslėgto skysčio ekstrakcija (PLE);
- Skysčio – skysčio ekstrakcija (LLE);

- Kietafazė ekstrakcija (SPE);
- Ultragarso ekstrakcija (UAE);

1.3.1 Ekstrakcija superkritiniu CO₂

Daugiausia atvejų išgaunant bioaktyvius junginius yra pasitelkiami ekstrakcijos procesai. Vienas populiariausių ekstrakcijos metodų yra ekstrakcija superkritiniu anglies dioksidu [23] (SFE-CO₂). Jis yra patrauklus tuo, kad išgaunant junginius nesusidaro pavojingų junginių, CO₂ yra nežalingas aplinkai. Be to, superkritinis CO₂ pasižymi puikiomis [13, 23] fizikinėmis (žr. 1.7 pav.) savybėmis:

- suteikia geresnį nei skysčiai ar dujos (žr. 1.3 lent.) difuziškumą;
- sumažinama klampa;
- beveik visiškai panaikinamas paviršiaus įtempis.



1.7 paveikslas. Skirtingų fazių medžiagų priklausomybės nuo slėgio ir temperatūros fazinių virsmų diagrama.

Fazinių virsmų diagramoje matyti, kaip medžiaga priklausomai nuo temperatūros ir slėgio gali būti vienokios ar kitokios fazės. Linijos atskiriančios fazes nurodo, kur medžiaga kartu yra dviejų skirtingų fazių. Trigubas taškas nurodo atitinkamą temperatūrą ir slėgį, kuriame medžiaga tuo pačiu metu yra 3 skirtingų fazių: kieta, dujinė ir skysta. Superkritinis skystis susidaro tame taške, kuriame kertasi kritinė temperatūra (T_{kr}) ir kritinis slėgis (P_{kr}). Toliau keliant šiuos rodiklius, išlieka ta pati superkritinio skysčio fazė.

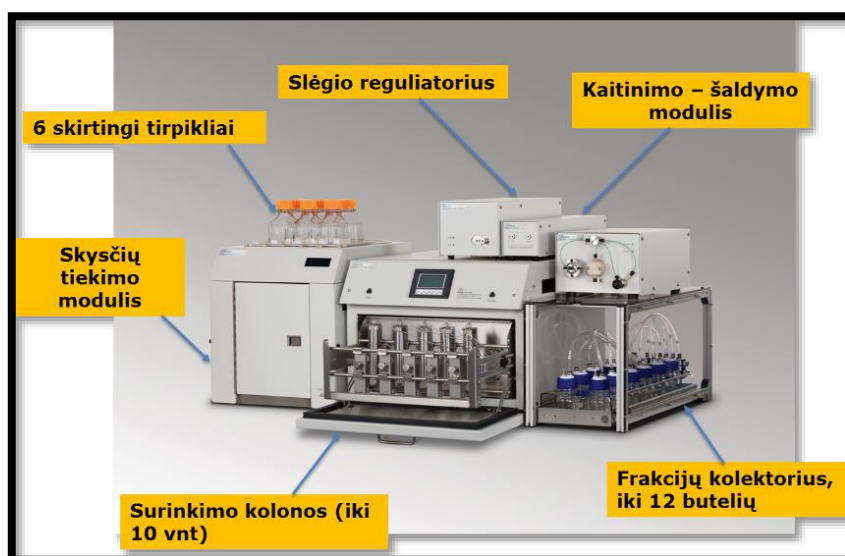
Taigi superkriziniais skysčiais gali virsti bet kokia medžiaga esant pakankamai aukštai temperatūrai ir slėgiui. Atsižvelgiant į ekonominius sumetimus, praktiškai yra naudojamos tik keletas medžiagų, kurios yra paverčiamos [24] superkriziniais skysčiais, t. y. anglies dioksidas, vanduo, etanolis ir t. t. Minėtos medžiagos pasižymi maža savikaina bei yra netoksiškos aplinkai.

1.3 lentelė. Skirtingų fazių fizikinių savybių palyginimas

Fizikinė charakteristika	Dujos	Superkrizinis skystis	Skystis
Tankis ($\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$)	0,6 – 2	200 – 900	600 – 1000
Dinaminė klampa ($\text{mPa}\cdot\text{s}$)	0,01 – 0,3	0,001 – 0,003	0,2 – 3
Difuzijos koeficientas ($10^6\cdot\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$)	10 – 40	0,07	20 – 40
Paviršiaus įtempis ($\text{dyn}\cdot\text{cm}^{-2}$)	–	–	20 – 40

Ekstrakcija SFE- CO_2 plačiai naudojama aliejingų frakcijų išgavimui, nes CO_2 yra nepolinis junginys. Taip pat atliekant keletą modifikacijų galima palaipsniui išskirti ir labiau polines molekules. Tokiu atveju į ekstrahuojamą žaliavą būtina pridėti polinių tirpiklių. Vienas populiariausių yra etanolis dėl savo mažai kenksmingų savybių ir gebėjimo greitai pasišalinti garavimo metu.

Pagrindinė problema su kuria susiduriama atlikus ekstrakciją, tai pačių aktyviausių junginių išskyrimas į atskirus junginius, frakcijas. Gryni bioaktyvūs junginiai [26] sukuria didesnę pridėtinę vertę ekonominiu požiūriu ir yra tikslingiau pritaikomi savo paskirties srityje. Dažniausiai išgryninti bioaktyvūs junginiai yra naudojami farmacijos ir kosmetikos pramonėse. Paskutiniaisiais dešimtmečiais atsiradus būtinybei išgryninti junginius yra sukuriama vis daugiau automatizuotų sistemų. Viena populiariausių yra SFE- CO_2 ekstrakcija sujungta su slėgine (*angl. flash*) chromatografija (žr. 1.8 pav.).



1.8 paveikslas. SFE-CO₂ ekstraktorius sujungtas su „flash“ chromatografijos išskirstymo kolonėle.

Superkritiniai skysčiai taipogi gali būti pritaikomi ir kituose biotechnologiniuose [25] procesuose, kuriuose naudojami:

- Inhibitorinių junginių pašalinimui iš mikroorganizmų mitybinės terpės;
- Mikroorganizmų ląstelių sienelių suardymui, siekiant išvengti mikrobinio užterštumo ekstrahuojamoje medžiagoje arba siekiant atpalaiduoti viduląstelinis bioaktyvius junginius;
- Fermentinėms reakcijoms suaktyvinti;
- Po fermentinės reakcijos susidariusių bioaktyvių junginių ekstrakcijai;
- Organinių tirpiklių pašalinimui iš fermentatoriaus nepertraukiant fermentacijos;
- Greitam DNR ir baltymų išskyrimui iš mikroorganizmų.

1.3.2 Suspausto skysčio ekstrakcija

Poliniai junginiai iš biomasės yra ekstrahuojami naudojant suspausto slėgio ekstrakciją (PLE), kurio metu ekstrakcija atliekama esant aukštam slėgiui ir temperatūrai. PLE [26] padidina ekstrakcijos išeigas lyginant su tradiciniais ekstrahavimo metodais esant atmosferiniam slėgiui ir kambario temperatūrai. Siekiant išekstrahuoti skirtingo poliškumo junginius, naudojami keletas skirtingo poliškumo tirpiklių. Populiariausi yra acetonas, etanolis (70 %) ir vanduo. Ekstrahavimo procesas atliekamas tą pačią žaliavą veikiant skirtingais tirpikliais. Šiuo metu PLE atliekama automatizuotomis sistemos ir skirtingais tirpikliais veikiant tą pačią žaliavinę medžiagą. Ekstrahavimo tirpikliais metu dažniausiai yra atliekamas pakopinis ekstrahavimas, t. y. ekstrakcija pradedama nuo mažiausio poliškumo tirpiklio panaudojimo ir užbaigiama didžiausio poliškumo tirpikliais. PLE efektyvumas priklauso nuo keletos veiksnių, kurie pavaizduoti 1.4 lentelėje.

1.4 lentelė. PLE efektyvumą įtakoiantys veiksniai.

Matricos apibūdinimas	Ekstrakcijos tipas	Ekstrakcijos režimas	Faktoriai įtakoiantys ekstrakciją	Ekstrakcijos stiprinimo agentai
Biomasės prigimtis	Tirpumo kontroliavimas	Dinaminis	Tirpiklio tipas	Drėkinantys priedai
Biomasės matricos ryšiai	Difuzijos kontroliavimas	Statinis	Temperatūra	Dispersiniai priedai
Dalelių dydis			Laikas	Kiti priedai
Vandens kiekis				

1.3.3 Skysčio – skysčio ekstrakcija

Skysčio – skysčio ekstrakcija (LLE) [13] yra pats paprasčiausias ekstrahavimo metodas. Ekstrahavimas laboratorinėmis sąlygomis atliekamas dalijamuoju piltuvu, o gamybinėmis sąlygomis naudojant rotorinius ekstraktorius. Šiuo metodu dažniausiai pašalinamos druskos iš organinių tirpiklių arba atliekamas dalinis tirpių medžiagų išskirstymas pagal tirpumą, priklausomai nuo poliškumo. Ekstrahavimas yra greitas, o surinktos atskiros frakcijos koncentruojamos dažniausiai rotoriniu vakuuminiu garintuvu.

1.3.4 Kietafazė ekstrakcija

Kietafazė ekstrakcija (SPE) naudojama augalinių mėginių paruošimui, kuomet junginiai yra suspenduojami tirpiklyje. Šios ekstrakcijos metu skystyje esantys ištirpę junginiai yra išskirstomi pagal savo fizikines ir chemines savybes. SPE [27] tinka koncentruoti ir gryninti norimas analizuoti analites. Ekstrahavimas atliekamas leidžiant analizuojamą skysti mobiliąja faze per kietos fazės įkrovą. Priklausomai nuo ekstrahuojamų medžiagų galimi keli ekstrahavimo variantai:

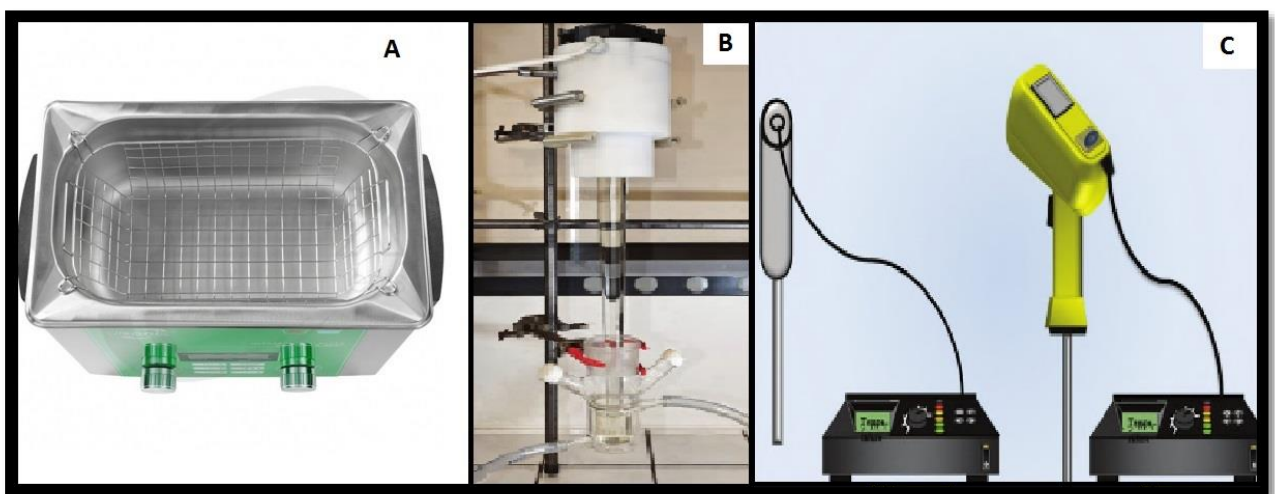
- normalių fazių;
- atvirkščių fazių;
- anijonų mainų;
- katijonų mainų.

Ekstrahavimui atlikti dažniausiai naudojamos jau iš anksto paruoštos komercinės ekstrahavimo kolonėlės arba švirškštai.

1.3.5 Ekstrakcija ultragarsu

Ekstrakcija ultragarsu (UAE) yra vis sparčiau pritaikomas ekstrahavimo metodas, vadinamas XXI amžiaus ekstrahavimo metodu. UAE [13] šiuo metu yra laikomas perspektyviausiu ekstrahavimo metodu, nes varijuojant ultragarso parametrais galima efektyviai padidinti įvairių frakcijų išgavimą iš augalinės žaliavos. Dėl savo nežalingo poveikio ultragaras taikomas farmacinių, kosmetikos ir chemijos ekstraktų gamyboje. Ultragarso ekstrakcijos procese svarbus dažnis, kuris atitinkamai siekia nuo 20 kHz iki 10MHz. Varijuojant dažnio intensyvumu gaunamas skirtingas biomasės ardomas veikimas.

Ultragarsu galima apdoroti (žr. 1.9 pav.) žaliavą netiesiogiai ir tiesiogiai. Netiesioginio apdorojimo



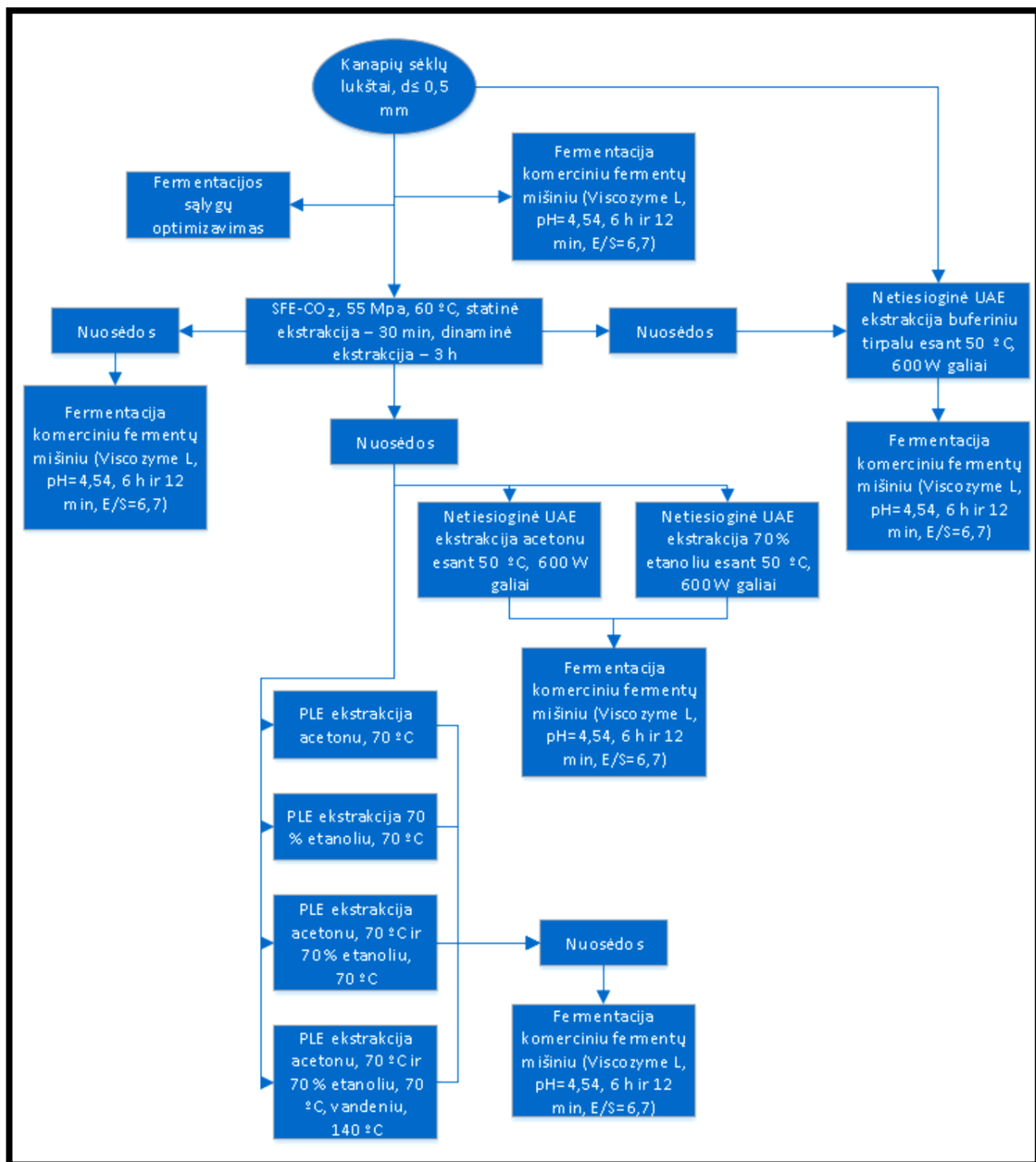
1.9 paveikslas. Apdorojimo ultragarsu įranga: A – ultragarso vonelė netiesioginiam apdorojimui, B kvarcinis ultragarso elektrodas tiesioginiam apdorojimui, C – titano ultragarso elektrodas tiesioginiam apdorojimui.

metu kolba su bandiniu yra patalpinama į ultragarso vonelę, kurioje yra reguliuojamas ultragarso dažnis ir temperatūra. Tiesiogiai žaliava apdorojama, kai į kolbą su bandiniu yra įmerkiamas ultragarso elektrodas. Dažniausiai naudojami elektrodai, kurie yra pagaminti iš kvarco arba titano.

2. Medžiagos ir tyrimų metodai.

2.1 Tiriamųjų darbų technologinė schema

Tiriamieji darbai atlikti pagal žemiau pateiktą technologinę schemą (žr. 2.1 pav.), kurioje atspindi tyrimuose naudotos įvairių ekstraktijų ir fermentacijų sąlygos.



2.1 paveikslas. Technologinė schema.

2.2 Pirminis kanapių sėklų lukštų biomasės apdorojimas

Tyrimams atlikti buvo naudojami džiovinti kanapių *Cannabis sativa* L. sėklų lukštai, kurie sumalti [28] sietiniu malūnu. Smulkinimas buvo atliktas esant 10000 aps/min naudojant sietą, kuris susmulkino lukštus į ne didesnius negu 0,5 mm diametro skersmens. Smulkinta žaliavinė kanapių lukštų biomasė buvo panaudota fermentacijos proceso optimizavimui bei įvairioms SFE-CO₂, PLE, UAE ekstrakcijoms atlikti. Taip pat, kanapių lukštai panaudoti atlikti fermentavimo procesus su įvairiais ekstrakcijos metodais apdorota žaliava.

2.3 Reduojančių cukrų analizė DNS metodu

Reikalinga įranga: 15 mL polipropileningi mėgintuvėliai su kamštuku, vienkartinės pipetės, vonelė su vandeniu ir ledukais, spektrofotometras.

Reikalingi reagentai: 3,5-dinitrosalicilinė rūgštis, 10 g, fenolis, 2 g, natrio sulfitas, 0,5 g, natrio hidroksidas, 10 g, 1 litras dejonizuoto vandens, kalio natrio tartrato tirpalas, 40 %.

DNS [20, 21] reagento mišinys ruoštas 1 L tūrio matavimo kolboje. Iš pradžių į matavimo kolbą įpilta pusė litro dejonizuoto vandens, o po to lėtai subertas atitinkamas kiekis natrio hidroksido. Kolba lengvais rankos judesiais maišoma, kol ištirpsta natrio šarmas. Palaukiama, kol šarmo tirpalas atvėsta iki kambario temperatūros. Sekančiu etapu supilamas atitinkamas kiekis skysto fenolio (50 °C) ir suberiama 3,5-dinitrosalicilinė rūgštis bei natrio sulfitas. DNS reagentas saugojamas tamsiame butelyje ir spintelėje, siekiant išvengti tiesioginių saulės spindulių. Kalibravimo kreivei sudaryti naudota L-gliukozė, kaip redukuojantis agentas, kurios koncentracijos ribos siekia nuo 0,312 iki 5 mg/mL.

Procedūra:

- 3 mL DNS reagento sumaišomi su 1 mL skysto mėginio 15 mL polipropileningame mėgintuvėlyje. Turinys užkemšamas.
- Mėgintuvėliai patalpinami į karšto 90 °C vandens vonelę. Reakcija vykdoma 5 min. Mėginiuose, kuriuose yra redukuotų cukrų, po inkubavimo periodo susidaro raudonai ruda spalva;
- Pasibaigus reakcijai mėgintuvėliai su bandiniais ištraukiami iš vonelės bei staigiai patalpinami į šaltą vandenį su ledukais, o po to mėgintuvėlių turinį dar papildome 1 mL 40 % kalio natrio tartrato tirpalu, kuris padeda stabilizuoti spalvą.
- Po mėginių atvėsinimo iki kambario temperatūros, matuojama absorbcijos sugertis esant 540 nm bangos ilgiui.

2.4 Fermentų mišinio karboksimetilceliuliazinio aktyvumo nustatymas

Reikalinga įranga: 15 mL polipropileningi mėgintuvėliai su kamštuku, vienkartinės pipetės, vonelė su vandeniu ir ledukais, inkubatorius, spektrofotometras.

Reikalingi reagentai: karboksimetilceliuliozės tirpalas, 2 %, Viscozyme L komercinis fermentų mišinys, 50 mmol/L (pH=4,54) natrio citrato buferinis tirpalas, bevandenė, gryna L – gliukozė, DNS reagentas, kalio natrio tartrato tirpalas, 40 %.

Komercinio fermentų mišinio Viscozyme L endo-beta-1,4-gliukanazės aktyvumui įvertinti buvo pasirinktas karboksimetilceliuliazės [21] aktyvumo nustatymo tyrimas. Aktyvumui nustatyti, kaip substratas naudota 2% karboksimetilceliuliozė ištirpinta 50 mmol/L natrio citrato buferiniame tirpale. Kalibracinei kreivei sudaryti naudojama L-gliukozė, kurios koncentracijos ribos yra nuo 0,312 iki 5 mg/mL. Fermentų aktyvumo tyrimui atlikti taip pat naudojame bandinį be fermento, kuris skirtas absorbcijos spektro nulinei vertei nustatyti bei bandinį su fermentu, bet be substrato, kuris skirtas įvertinti fermento mišinio suteikiamai spalvai po DNS reakcijos atlikimo.

Proceso eiga:

- 0,5 mL fermentų mišinio ištirpinto 50 mmol/L natrio citrato buferiniame tirpale sumaišyta su 0,5 mL kristalinės karboksimetilceliuliozės substrato tirpalu, atsargiai suplakta, kad nesusidarytų putos, kurios gali sukelti fermentų inhibiciją dėl sąlyčio su aplinkos deguonimi, ir inkubuota esant 50 °C temperatūrai 30 min.
- Po to į mėgintuvėlius su bandiniais staigiai pridedama po 3 mL DNS reagento. Mėgintuvėliai patalpinami į karšto 90 °C vandens vonelę. Reakcija vykdoma 5 min.
- Pasibaigus reakcijai mėgintuvėliai su bandiniais ištraukiami iš vonelės bei staigiai patalpinami į šaltą vandenį su ledukais, o po to mėgintuvėlių turinį dar papildome 1 mL 40 % kalio natrio tartrato tirpalu, kuris padeda stabilizuoti spalvą.
- Po mėginių atvėsavimo iki kambario temperatūros, matuojama absorbcijos sugertis esant 540 nm bangos ilgiui.
- Gautos absorbcijos vertės perskaičiuojamos į aktyvumo vienetus.

Aktyvumo skaičiavimo eiga:

- įvertiname fermentų mišinio praskiedimo laipsnį;
- apskaičiuojame kiek gliukozės KMC reakcijos metu yra atpalaiduojama. KMC vienetai išreiškiami pagal tarptautinius IU (*angl.* International Units) vienetus. Taigi:
 $1 IU = 1 \mu\text{mol} * \text{min}^{-1}$ reakcijos produkto arba $1 IU = 0,18 \text{ mg} * \text{min}^{-1}$ atpalaiduotos gliukozės.

Kritinis gliukozės kiekis KMC reakcijoje aprašytoje anksčiau yra 0,5 mg, taigi gliukozės susidarymas išreikštas aktyvumo vienetais būtų (žr. 1 formulė):

$$0,5 \text{ mg susidariusios gliukozės} = \frac{0,5}{0,18 \cdot 0,5 \cdot 30} = 0,185 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}, (IU \cdot \text{mL}^{-1})$$

(1)

Įvertinus praskiedimą apskaičiuojame KMC aktyvumo (žr. 2 formulė) vienetus:

$$KMC = \frac{0,185}{\text{praskiedimo laipsnis}} IU \cdot \text{mL}^{-1} \quad (2)$$

2.5 Ekstrakcija SFE-CO₂ automatizuotame ekstraktoriuje

Reikalinga įranga, medžiagos: svarstyklės, pilotinis SFE-CO₂ ekstraktorius su 10 L tūrio ekstrahavimo cele, mažo ekstrahuojamo tūrio (celės tūris – 34 mL) SFE-CO₂ ekstraktorius, indas ekstraktui surinkti, filtrinis popierius.

Reikalingi reagentai: suskystintas CO₂, 70 % etilo alkoholis.

Darbo metu, priklausomai nuo ekstrahuojamos medžiagos kiekio, buvo naudota 10 L arba 34 mL celė. Pilotinis, 10 L tūrio celę turintis ekstraktorius buvo naudojamas siekiant gauti didelius kiekius superkritiniu CO₂ [28] apdorotų kanapių lukštų, kurie toliau buvo naudojami sekantiems tyrimams. Mažo celės tūrio ekstraktorius naudotas atlikti tyrimus mažu masteliu su medžiaga, kuri buvo papildomai apdorota ultragarsu, fermentavimo arba kitais kombinuotais procesais. Visiems ekstrahavimo procesams atlikti buvo naudojami žaliaviniai kanapių sėklų lukštai, esantys ne didesnio, negu 0,5 mm skersmens diametro.

Ekstraktoriaus celės montavimas prasideda nuo filtrinio popieriaus patalpinimo celės dugne. Po to seka celės įkrovimas ekstrahuojamąja medžiaga. Visiškai pakrauta celė dedama ant svarstyklių ir sverinama. Žinant tuščios celės svorį, perskaičiuojama ekstrahuojamosios medžiagos masė pagal 3 formulę.

$$m_b = m_{b+c} - m_c \quad (3)$$

m_b – biomasės masė, g

m_{b+c} – biomasės su cele masė, g

m_c – celės masė, g

Sekančiu etapu užveržiamas celės dangtis ir ji su bandiniu patalpinama į ekstraktorių. Ekstraktoriaus kompiuterinėje programoje nustatome ekstrahavimo parametrus. Slėgį sistemoje keliamo palaipsniui, t. y. po 10 bar, kol pasiekiamo tikslinį slėgį. Visi bandiniai buvo apdoroti esant sekančioms sąlygoms:

- 55 MPa slėgiui;
- 60 °C temperatūrai;
- 30 min išlaikant statinę ekstrakciją;
- 180 min palaikant dinaminę ekstrakciją.

Statitinė ekstrakcija atliekama siekiant biomasės matricą ir kiek įmanoma ląsteles pripildyti ekstrahento (superkritinio CO₂). Po statinės ekstrakcijos seka dinaminė ekstrakcija, kuomet superkritiniam CO₂, membraninių siurblių pagalba, leidžiama judėti per ekstrahuojamą medžiagą. Superkritinio CO₂ debitą reikia pasirinkti tokį, kad proceso metu neužšaltų vamzdžiai, t. y. apie 2 L/min pilotiniam SFE-CO₂ ekstraktoriui arba 20 mL/min mažos ekstrahavimo talpos ekstraktoriui. Proceso metu iš bandinio išekstrahuojami nepoliniai junginiai.

Atlikus ekstrahavimo procesą, surenkamas grynas ekstraktas, nes CO₂ kambario sąlygomis tiesiog išgaruoja. Pasveriamas tikslus ekstrakto kiekis ir įvertinus prieš ekstrakciją naudotos medžiagos masę, paskaičiuojama ekstrahavimo išeiga (žr. 4 formulė) procentais.

$$I = \frac{m_{eks}}{m_b} * 100 \quad (4)$$

I – išeiga, %

m_{eks} – ekstrakto masė, g

m_b – biomasės masė, g

Surinktas ekstraktas saugojamas šaldytuve esant + 4 °C temperatūrai. Kietoji biomasės frakcija sudedama į vakuuminį užspaudžiamą maišelį ir paliekama saugoti spintelėje, tamsoje.

2.6 Ekstrahavimas suspausto skysčio ekstraktoriumi

Reikalinga įranga: automatinis suspausto slėgio ekstraktorių, 200 mL užkemšami ekstrakto surinkimo indai, rotorinis vakuuminis garintuvas, liofilizatorius.

Reikalingi reagentai: 70 % etilo alkoholis, grynas acetonas, dejonizuotas vanduo, filtrinis popierius, dolomito žemė.

Suspausto slėgio ekstrakcijoms atlikti naudotas automatinis ekstraktorių [26] su kolektoriumi, kuriame yra sudėti užkemšami 200 mL tūrio indai. Iš pradžių surenkama nerūdijančio plieno 34 mL arba 66 mL tūrio ekstrahavimo celė. Du filtrinio popieriaus lapelius, kuriuos naudosime uždengti celės dugnui ir dangteliui, pasveriamo, kad galėtume tiksliai įvertinti celės svorį. Taip pat, tiksliai pasveriamo 2 g dolomitinės žemės, kurią reikia sumaišyti su ekstrahuojama medžiaga. Dolomitinę žemę naudojame tada, kuomet vykdant pakopinę

ekstrakciją yra naudojamas vanduo. Kitu atveju, aukštos temperatūros (140 °C) vanduo sulipina ekstrahuojamą medžiagą ir ekstrakcijos procesas tampa nebe efektyvus. Žinodami tikslų celės, dolomitinės žemės ir reikalingo filtrinio popieriaus svorį, surenkame celę su ekstrahuojama medžiaga. Pagal 3 formulę apskaičiuojame tikslų biomasės svorį. Ekstrakcijos sąlygos pateiktos žemiau:

- acetono ir etanolio darbinė temperatūra - 70 °C, o vandens 140 °C;
- atlikti 3 arba 4 statinės ekstrakcijos ciklai po 5 min;
- 10,3 MPa išlaikomas darbinis slėgis celėje.

Celė su bandiniu patalpinama į automatinį suspausto slėgio ekstraktorių, kur yra užpildoma tirpikliu, pasiekiant darbinės sąlygas. Visi tirpikliai prieš ekstrakciją yra apdorojami ultragarso vonelėje, kad būtų pašalinti visi susidarę oro mikroskopiniai burbulai. Ciklas trunka 5 min, o po to susidaręs ekstraktas yra išplaunamas iš celės tokiu pačiu tirpikliu, kaip ir buvo vykdoma ekstrakcija. Sunaudojamas tirpiklio tūris atitinka 6/10 celės tūrio. Jeigu atliekamas pakopinis ekstrahavimas, tai sekančiu žingsniu ekstrahavimo celė 1 min apdorojama azoto dujomis. Taip celė su bandiniu paruošiama kitai ekstrakcijai su kitu tirpikliu.

Surinkti ekstraktų tirpalai, kurių tirpiklis yra acetonas arba etanolis, supilami į skirtingas žinomo svorio kolbas. Garinimas atliekamas rotaciniu vakuumu sudarančiu garintuvu. Tirpiklių pašalinimo metu kolbose palaikomas apie 40 °C temperatūra ir sudaromas vakuumas apie -0,6 arba -0,8 atm. Vakuumas sudaromas toks, kad dėl slėgio skirtumų, tirpiklio ir ekstrakto mišinys nebūtų perneštas į gryno tirpiklio surinkimo indą. Vizualiai nustatius, kad nusigarino visas tirpiklis ir kolboje liko tik ekstraktas, slėgis pažeminamas iki maksimaliai įmanomo mažiausio, t. y. apie -1 atm esant šimtųjų atmosferos dalių paklaidai. Tokiomis sąlygomis kolba su ekstraktu išlaikoma 20 min. Po to, kolbos nuimamos ir uždengiamos. Leidžiama joms pasiekti kambario temperatūrą. Tuščios kolbos pasveriamos ir žinant jų tikslus svorius apskaičiuojamas susidaręs gautas ekstrakto kiekis (žr. 5 formulė) bei įvertinama išėiga (žr. 4 formulė).

$$m_{eks} = m_{k+eks} - m_k \quad (5)$$

m_{eks} – ekstrakto masė, g

m_{k+eks} – ekstrakto su kolba masė, g

m_k – kolbos masė, g

Ekstraktai surenkami iš kolbų į tamsius stiklinius buteliukus, kurie sandariai uždaromi ir patalpinami į šaldytuvą esant +4 °C temperatūrai.

Vandenyje ištirpę ekstraktai, skirtingai nei esantys acetone ar etanolyje, yra liofilizuojami. Vanduo visiškai pašalinamas ir gaunamos grynos ekstraktų frakcijos. Kaip ir anksčiau aprašytoje tirpiklių pašalinimo procedūroje, įvertinami kolbų ir gautų ekstraktų svoriai (žr. 5 formulė).

Prieš liofilizavimą, ekstraktų kolbos yra užšaldomos vonelėje su azotu, lengvais rankos judesiais purtant ir vengiant vietinio ekstrakto sušalimo, nes užšalant vandeniui tirpalui didėja tūris, kuris gali suskaldyti kolbą. Visiškai užšaldžius kolbas, sumontuojame jas į liofilizatorių, kuriame jau iš anksto yra pasiekta $-110\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūra ir maksimalus vakuumas, apie -1 atm . Kolbas paliekame 18 valandų. Po to, įvertiname išėigas pagal 4 formulę. Galutiniame etape ekstraktai vėl surenkami iš kolbų į tamsius stiklinius buteliukus, kurie sandariai uždaromi ir patalpinami į šaldytuvą esant $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūrai.

2.7 Ekstrakcija netiesioginiu ultragarso poveikiu

Reikalinga įranga: ultragarso vonia skirta netiesioginiam apdorojimui ultragarsu, svarstyklės, matavimo cilindras, 150 mL apvaliadugnės kolbos.

Reikalingi reagentai: 70 % etilo alkoholis, grynas acetonas, 50 mmol (pH=4,54) natrio citrato buferinis tirpalas.

Iš pradžių į kolbas yra susveriamos medžiagos lygiai po 10 g, kurios taipogi atitinkamai yra pripildomos 100 mL acetono, 70 % etanolio arba buferinio tirpalo. Turinys gerai sumaišomas. Po to bandiniai yra apdorojami netiesioginiu ultragarsu. Netiesioginiu ultragarso poveikiu apdorojami bandiniai [29] yra patalpinami į ultragarso vonią su vandeniu, kuriuo sklinda ultragarso bangos. Kolbos panardinamos iki tiek, kad jose esantis tirpiklis arba buferinis tirpalas su medžiaga, būtų žemiau ultragarso vandens paviršiaus. Netiesioginio apdorojimo metu buvo išlaikoma $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūra, 650 W galia. Kiekvienas bandinys minėtomis sąlygomis išlaikytas 25 min.

Po apdorojimų ultragarsu, bandiniai toliau buvo veikiami ekstrakcijos arba fermentacijos procesais.

2.8 Fermentavimo sąlygų eksperimentinis planavimas

2.8.1 Fermentavimo sąlygų optimizavimo planavimas Design-Expert programa

Fermentavimo sąlygos naudojant Viscozyme L (102 KMC IU) fermentų mišinį nustatytos naudojant neapdorotą augalinę kanapių sėklų lukštų biomasę, kurios susmulktų dalelių dydis nesiekė daugiau negu 0,5 mm. Fermentavimo tyrimams atlikti sudarytas centrinis kompozicinis rotabilinis planas (CKRP) [28] su kompiuterine matematinius skaičiavimus atliekančia

programa Design – Expert. Kompiuterinėje programoje būtina nurodyti kintamuosius faktorius, kurie įtakoja fermentavimo efektyvumą.

Pasirinkti faktoriai:

- fermento su substratu santykis (E/S), (w/w);
- fermentavimo laikas, val;
- pH.

Temperatūros pokyčių įtaka fermentacijos procesui netirta ir pasirinkta 50 °C, kadangi literatūros analizės metu įsitikinta, jog esant šiai temperatūrai įvairių celiuliazinių fermentų aktyvumas yra pats didžiausias.

Pasirinkti faktorių intervalai pagal kuriuos buvo sudarytas centrinis kompozicinis rotabilinis planas: E/S santykio intervalas nuo 1 iki 10, fermentavimo laikas nuo 1 iki 10 valandų, pH nuo 3,5 iki 6,5. Design – Expert programos pagalba sudarytas 20 eksperimentų kompozicinis planas (žr. 2.1 lent.) pagal pasirinktus kintamuosius faktorius.

2.1 lentelė. CKRP kintamųjų vertės.

Faktoriai	fermentavimo	pH	E/S
	trukmė, val		
Kintamieji	-1	0	+1
Eil. nr.			
1	5,5	5	5,5
2	10	3,5	1
3	5,5	5	5,5
4	5,5	5	5,5
5	10	5	5,5
6	5,5	5	1
7	10	6,5	1
8	5,5	3,5	5,5
9	5,5	5	5,5
10	5,5	5	10
11	1	5	5,5
12	10	3,5	10
13	5,5	5	5,5
14	1	3,5	10
15	1	6,5	10
16	1	3,5	1

17	10	6,5	10
18	5,5	5	5,5
19	1	6,5	1
20	5,5	6,5	5,5

Kaip atsako signalas, minėtiems faktoriams, pasirinktas DNS metodu išmatuota redukuojančių cukrų (RC) koncentracija mg/mL. Svarbiausios matematinės išraiškos analizuojant CKRP yra determinacijos koeficientas (R^2) bei modelio kintamojo paklaida dispersijų santykis (P).

2.8.2 Fermentacijų atlikimas pagal sudarytą CKRP

Pagal Design-Expert programos pateiktą CKRP, buvo paruošta 20 skirtingų fermentavimo mišinių, kurios buvo atliktos 50 mL tūrio mėgintuvėliuose. Visuose mėgintuvėliuose buvo talpinama po 2,5 g žaliavinių kanapių, smulkintų 0,5 mm diametro sietiniu malūnu, bei supilta po 25 mL reikiamo pH buferinio tirpalo ir atitinkami kiekiai fermentų mišinio. Taipogi buvo paruošti mėgintuvėliai identiška tvarka be fermentų mišinio, siekiant išsiaiškinti, kaip buferinio tirpalo įtaka lemia ekstrakciją ir lignoceliuliozinės žaliavos hidrolizę. Visi mėgintuvėliai su reakcijos mišiniais inkubuoti kratyklėje esant 250 aps/min. Po fermentacijos proceso mėgintuvėliai patalpinti į vonelę su verdančiu vandeniu 5 min, kad inaktyvuoti fermentų mišinį, kuris baltų nuosėdų pavidalu iškrinta ant dugno. Mėgintuvėliai patalpinami į centrifugą, kurioje centrifuguojami 10 min, esant 20 °C temperatūrai ir 4500 aps/min. Po centrifugavimo, supernatantas su jame ištirpusiomis medžiagomis nudekantuojamas. Matuojama redukuotų cukrų (RC) koncentracija DNS metodu. Rezultatai suvedami į Design-Expert programą, kaip centrinio kompozicinio rotabilinio plano CKRP atsako signalas.

2.9 Optimalių fermentavimo sąlygų įvairiai apdorotai biomasei taikymas

Visos fermentacijos atliktos naudojant smulkintas kanapių lukštų luobeles, kurių diametras neviršija daugiau negu 0,5 mm, su papildomai atliktais biomasės apdorojimo procesais. Naudotas komercinis fermentų mišinys – Viscozyme L. Fermentacijos reakcijos atliktos 250 mL tūrio plastikiniuose buteliuose, kurie su reakcijos mišiniais buvo inkubuoti termostatinėje kratyklėje esant 50 °C temperatūrai ir 250 aps/min. Fermentacijos efektyvumas tirtas naudojant 10 g sausos medžiagos suspenduotos 100 mL 50 mM natrio citrato buferiniame tirpale ir paveikus 0,564 mL (0,67 g) Viscozyme L fermentų mišiniu. Po fermentacijos proceso buteliukai patalpinti į vonelę su verdančiu vandeniu 5 min, kad inaktyvuoti fermentų mišinį, kuris baltų nuosėdų pavidalu iškrinta ant dugno. Buteliukai patalpinami į centrifugą, kurioje centrifuguojami

10 min, esant 20 °C temperatūrai ir 4500 aps/ min. Po centrifugavimo, supernatantas su jame ištirpusiomis medžiagomis nudekantuojamas. Surinktas supernatantas liofilizuojamas, o po to atliekami išėigų skaičiavimai.

3. Tyrimų rezultatai ir jų aptarimas

3.1 Fermentavimo proceso optimizavimas

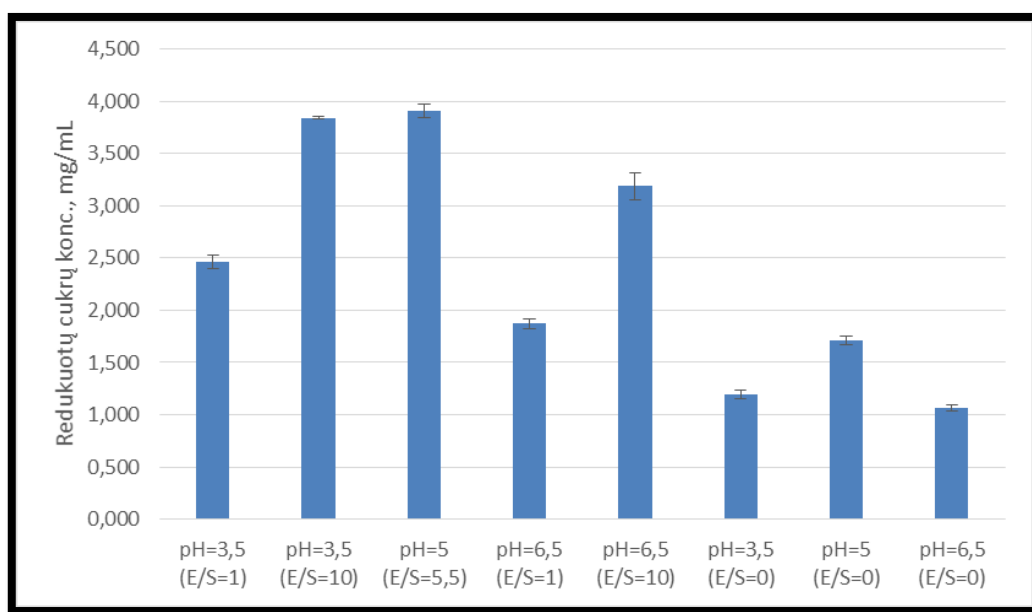
Fermentacijos efektyvumui užtikrinti atliekamas optimizavimas, kuris, varijuojant skirtingais faktoriais (trukme, pH, E/S) ir atsako, t. y. redukuotų cukrų koncentracija (mg/mL) po fermentacijos, suteikia galimybę nustatyti kiek įmanoma efektyvesnes sąlygas tolimesniems fermentacijos procesams. Atsako vertės pateiktos 3.1 lentelėje. Konkrečių, matematiškai pagrįstų fermentavimo optimizavimo darbų su kanapių lukštais literatūroje rasti nepavyko, todėl buvo atlikti darbai su kanapių biomase naudojant hidrolizuojantį fermentą Viscozyme L. Remiantis darbais, kuriuose augalinei žaliavai hidrolizuoti buvo naudotas fermentų [30, 31, 32] mišinys Viscozyme L, galima pastebėti, kad optimalus pH svyruoja nuo 4 iki 5, o inkubacijos temperatūra išlaikoma 50 °C. Daugiausiai varijuoja E/S santykis ir ekspozicijos laikas, kurie tarpusavyje yra tiesiogiai susiję. Tyrėjai siekdami sumažinti E/S kiekį prailgina ekspozicijos trukmę ir atvirkščiai. Tinkamas optimalių sąlygų pritaikymas gali sutaupyti laiko, sumažinti reagentų sąnaudas ir padidinti hidrolizės bioproduktų išeią.

3.1 lentelė. Fermentacijos efektyvumą įtakančių faktorių centrinio kompozicinio rotabilinio plano ir atsako vertės.

Eil. nr.	Laikas, val	pH	E/S	Redukuojantys cukrūs, mg/ mL
1	5.50	5.00	5.50	5,18 ± 0,21
2	10.00	3.50	1.00	2,97 ± 0,06
3	5.50	5.00	5.50	5,25 ± 0,07
4	5.50	5.00	5.50	5,36 ± 0,15
5	10.00	5.00	5.50	5,99 ± 0,03
6	5.50	5.00	1.00	4,13 ± 0,43
7	10.00	6.50	1.00	2,27 ± 0,05
8	5.50	3.50	5.50	5,42 ± 0,03
9	5.50	5.00	5.50	5,02 ± 0,09
10	5.50	5.00	10.00	5,88 ± 0,26
11	1.00	5.00	5.50	3,91 ± 0,06
12	10.00	3.50	10.00	6,84 ± 0,04
13	5.50	5.00	5.50	5,36 ± 0,18
14	1.00	3.50	10.00	3,84 ± 0,02
15	1.00	6.50	10.00	3,19 ± 0,13
16	1.00	3.50	1.00	2,46 ± 0,07

17	10.00	6.50	10.00	6,12 ± 0,20
18	5.50	5.00	5.50	5,24 ± 0,11
19	1.00	6.50	1.00	1,87 ± 0,05
20	5.50	6.50	5.50	4,14 ± 0,29

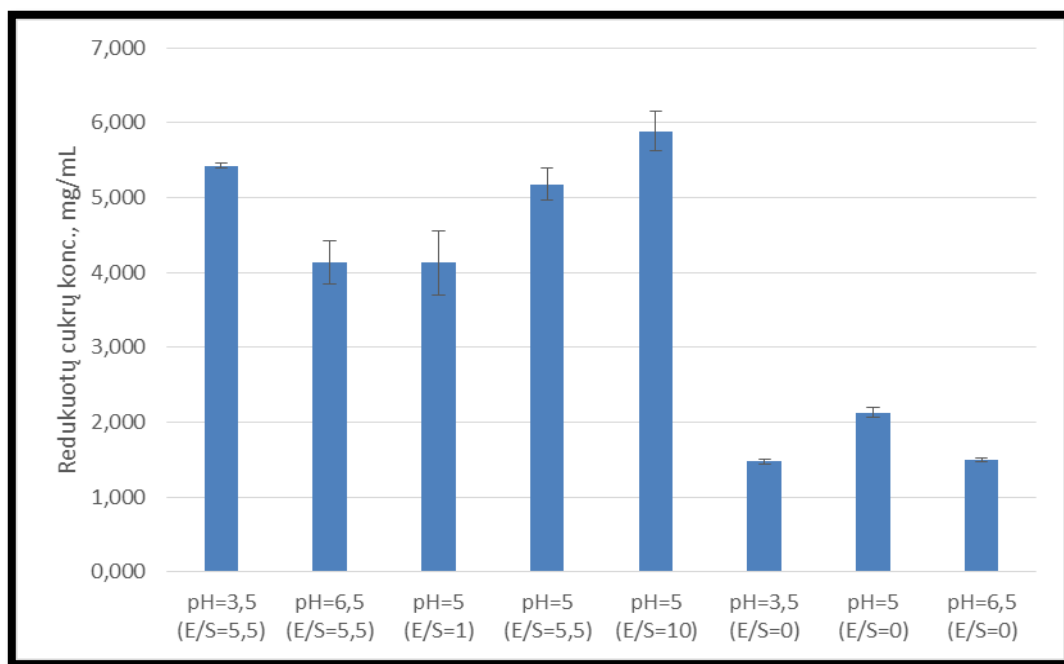
Darbo metu buvo įvertinta komercinio fermentų mišinio Viscozyme L įtaka kanapių lukštams. Papildomai atlikta hidrolizė – ekstrakcija tomis pačiomis sąlygomis, kaip ir įprastinės fermentacijos, tik be fermentų mišinio. Buferinio tirpalo su fermentų ir be fermentų mišinio hidrolizės rezultatai (žr. 3.1, 3.2, 3.3 pav.) suteikia galimybę teigti, kad fermentų mišinys Viscozyme L yra efektyvus naudoti lignoceliuliozinės žaliavos apdorojimui, nes fermentų mišinio hidrolizės efektyvumas yra didesnis, negu buferinio tirpalo įtaka žaliavos hidrolizei. Atitinkamai grafikuose pavaizduota išsiskyrusių redukuojančių cukrų kiekio priklausomybė nuo buferinio tirpalo pH ir E/S santykio (fermentinės hidrolizės reakcijų) bei tik buferinio tirpalo pH (hidrolizės be fermentų reakcijos), esant fiksuotai inkubacijos trukmei.



3.1 paveikslas. Redukuotųjų cukrų išėiga po 1 val terminės inkubacijos esant 50 °C.

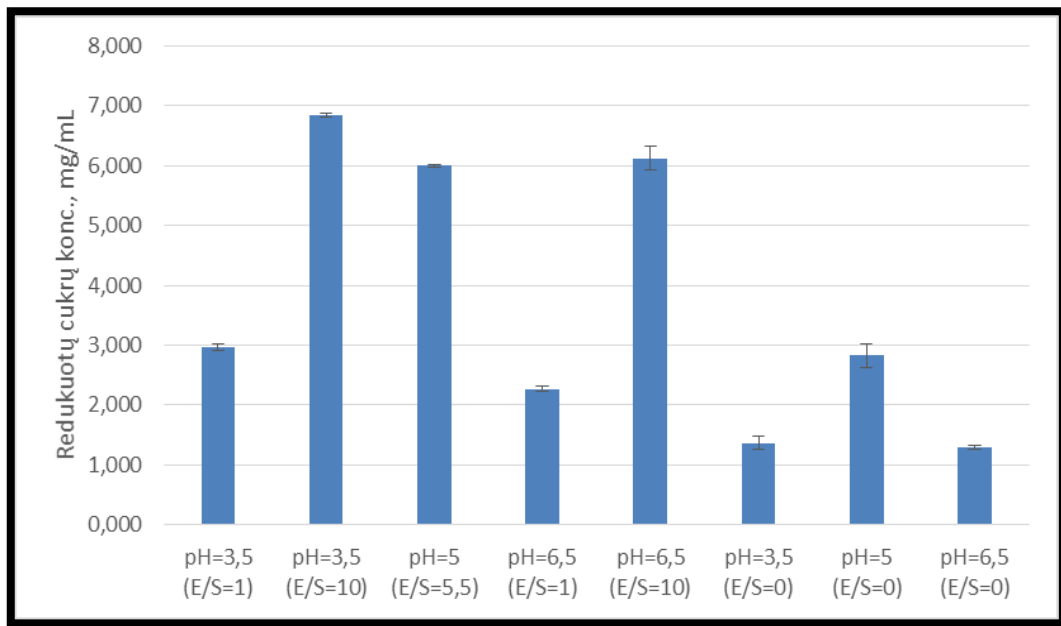
Atlikus redukuotųjų cukrų analizę po 1 val reakcijos mišinių inkubacijos, galima teigti, jog efektyviausiai fermentinės reakcijos vyksta esant pH=5. Be to, galima pastebėti, jog esant minėtai pH vertei, reikalingas mažesnis E/S santykis, siekiant išgauti didesnę RC kiekį. Būtina atkreipti dėmesį, jog buferinio tirpalo hidrolizės įtaka, esant pH=5, taip pat yra didesnė. Lyginant RC išėigas esant pH=3,5, matome, kad net mažas fermento substrato santykis E/S=1 ganėtinai stipriai paspartina hidrolizę. Nors šio E/S ir pH reakcijos mišinys, išėigų atžvilgiu, atrodo daug

žadantis, bet lyginant reakcijos mišinio efektyvumą tomis pačiomis pH=3,5 sąlygomis ir esant maksimaliam fermentų santykiui E/S=10, jis tampa nebe toks svarbus.



3.2 paveikslas. Redukuotų cukrų išėiga po 5,5 val terminės inkubacijos esant 50 °C.

Reakcijų mišiniai, kurie buvo inkubuoti 5,5 val, pasižymėjo sąlyginai didele RC išgava, lyginant visus rezultatus tarpusavyje, gautus po skirtingos trukmės inkubacinio laikotarpio. Iš rezultatų galima matyti, kad fermentacijos mišiniai esant pH=3,5 ir pH=5 ir vienodam fermento substrato E/S=5,5 santykiui, turi labai panašias redukuotų cukrų išėigas. Šie rezultatai jau šiuo metu leidžia teigti, jog komercinis fermentų mišinys Viscozyme L aktyvesnis rūgštinėje terpėje. RC koncentracijos nustatytos esant pH=6,5 yra mažos, atsižvelgiant į kitų reakcijos mišinių E/S santykį. Lyginant buferinių tirpalų hidrolizės įtaka RC koncentracijai po 5,5 val inkubacijos ir 1 val, matyti, kad skirtingų pH buferiniai tirpalai ir toliau skatina hidrolizę, bet atsižvelgus į RC koncentracijas po fermentinės hidrolizės, ši įtaka tampa sąlyginai maža.



3.3 paveikslas. Redukuotų cukrų išeiga po 10 val terminės inkubacijos esant 50 °C.

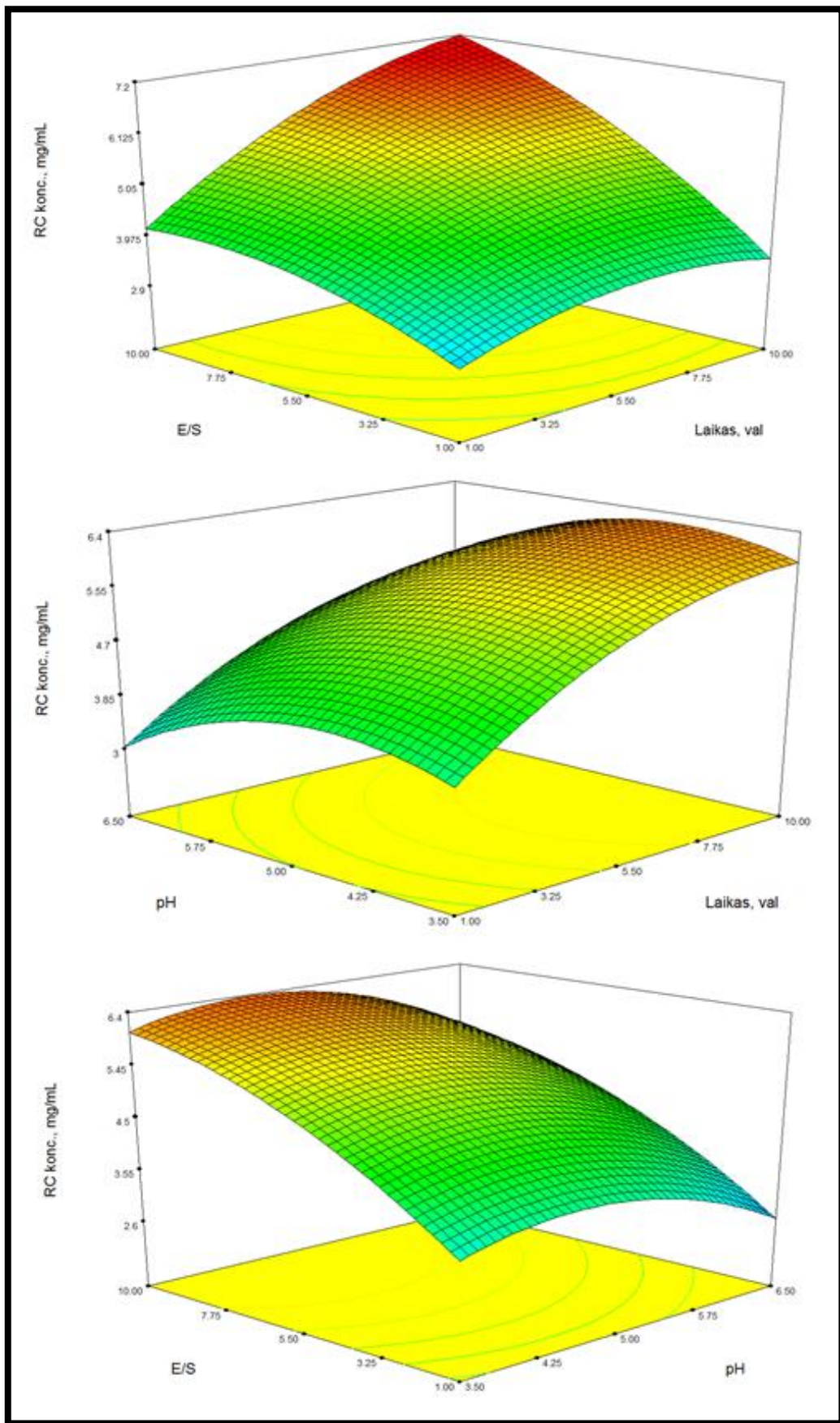
Reakcijų mišiniai po 10 valandų inkubacijos laikotarpio pasiekė maksimalias RC koncentracijos vertes. Didžiausia vertė pasiekta esant pH=3,5 ir E/S=10. Beveik vienodos RC koncentracijos pasiektos esant pH=5 ir pH=6,5, bet vertinant, kad reakcijos mišinys esant pH=5 turi beveik dvigubai mažesnę E/S santykį, efektyviausiai fermentavimo procesas veikia yra esant pH=5.

Design – Expert programoje atliekamas rezultatų analizavimas, panaudojant sukauptus RC duomenis. Optimalių sąlygų parinkimas atliekamas programa Design – Expert apdorojant atsako (RC) priklausomybę nuo kintamųjų faktorių (trukmės, E/S, pH). Programa automatiškai apskaičiuoja optimalias proceso sąlygas. Galima pasirinkti iš keletos nustatytų reikšmių pagal aktualiausią norimą gauti rezultatą. Trimačiuose (žr. 3.4 pav.) grafikuose vizualiai puikiai atsispindi atsako priklausomybė nuo kintamųjų faktorių.

Centriškai kompozicinį rotabilinį planą įvertinantys parametrai yra:

- determinacijos koeficientas, kuris lygus $R=0,9807$,
- koreguotas determinacijos koeficientas, kuris lygus $R^2=0,9633$,
- prognozuotas koreguotas determinacijos koeficientas $R^2= 0,8778$,
- dispersijų santykio paklaida $P=0,0199$.

Apskaičiuoti determinacijos koeficientai leidžia teigti, jog planas buvo sudarytas tinkamai ir jo duomenys gali būti sėkmingai panaudoti adekvačiai įvertinti proceso optimizavimo sąlygas.

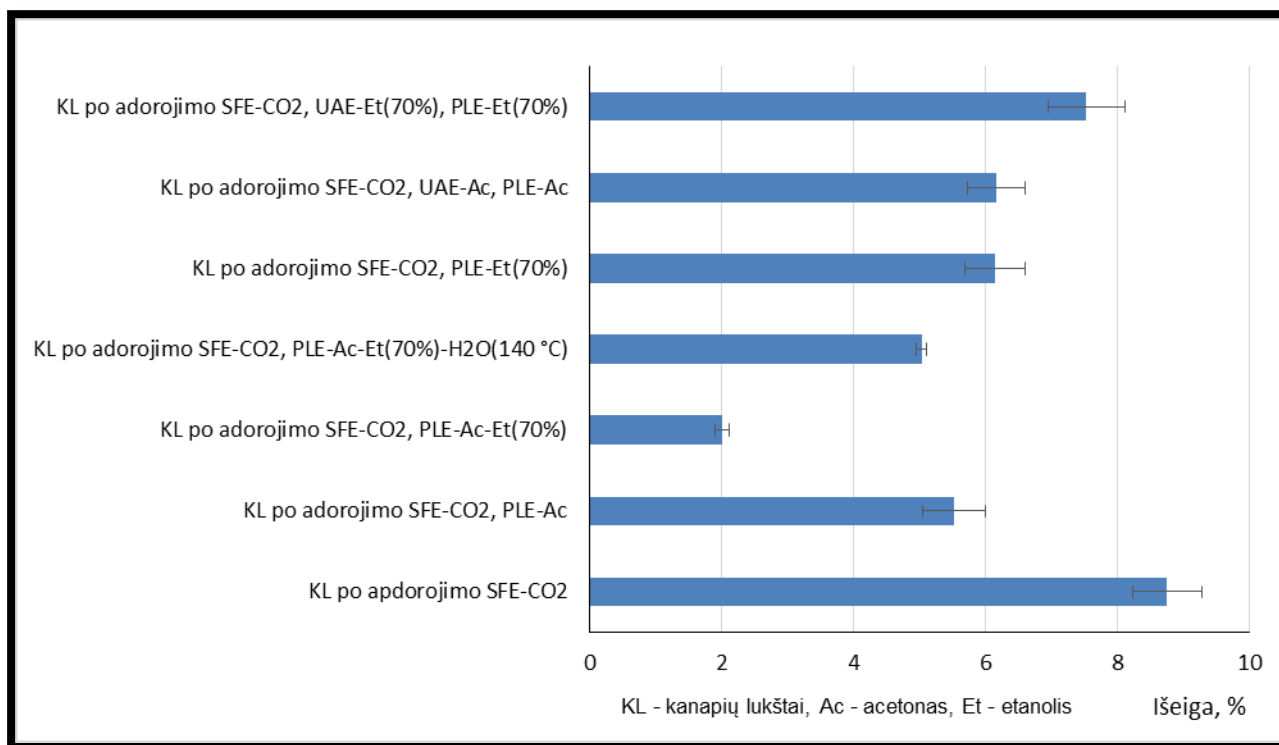


3.4 paveikslas. RC priklausomybė nuo kintamųjų faktorių (E/S, trukmės ir pH).

Optimalios fermentavimo sąlygos pateikiamos Design – Expert programa įvertinus kintamųjų kriterijų ir atsako svarbumą. Fermento kiekis ir jo santykis su substratu pasirinktas pagal nustatytas optimalias sąlygas kompiuterine programa Design-Expert. Siekiant išvengti perteklinio fermentų mišinio kiekio skystojoje frakcijoje, buvo pasirinkta E/S santykį minimizuoti. Taip pat buvo minimizuotas trukmės intervalas. Fermentacijos trukmė turi būti pasirinkta tokia, kad reakcijos mišinių inkubacijos laikotarpiu neprasidėtų nepageidaujamas mikroorganizmų augimo proveržis. pH apskaičiuotos įvertinant vienodai visas galimas pH intervalo reikšmes. Redukuotų cukrų RC kiekio atsakas maksimizuotas, nes tai yra rodiklis, kuris apibūdina fermentacijos efektyvumą. Optimalus fermento substrato santykis E/S siekė 6,7%, pH vertė – 4,54, inkubavimo trukmė – 6 val 12 min.

3.2 Kanapių sėklų lukštų ekstraktų išėigos po skirtingų ekstrakcijos apdorojimo procesų

Kanapių sėklų luobelės iš pradžių apdorotos SFE-CO₂, PLE, UAE ekstrakavimo procesais. Išekstrahuotos medžiagos surinktos ir sukonzentruotos vakuuminio rotoriniu garintuvu (organinių tirpalų ekstraktai) arba liofilizatoriumi (neorganinių tirpalų ekstraktai). Gautos ekstraktų išėigos grafiškai pavaizduotos 3.5 paveiksle.



Paveikslas 3.5. Ekstraktų mišinių išėigos po skirtingų ekstrakcijos metodų pritaikymo.

Iš 3.5 paveiksle pateiktų duomenų matyti, kad daugiausia kanapių sėklų luobelėse vyrauja nepoliniai organiniai junginiai. Tai atspindi apskaičiuota ekstrakto išeiga po apdoravimo SFE-CO₂, kuri siekia 8,75±0,518 %. SFE-CO₂ ekstrakcija apdorota kanapių lukštų biomasė sekančiais etapais naudota atlikti ekstrakcijoms didesnio poliškumo organiniais tirpikliais, kaip acetonas, etanolis ir vanduo.

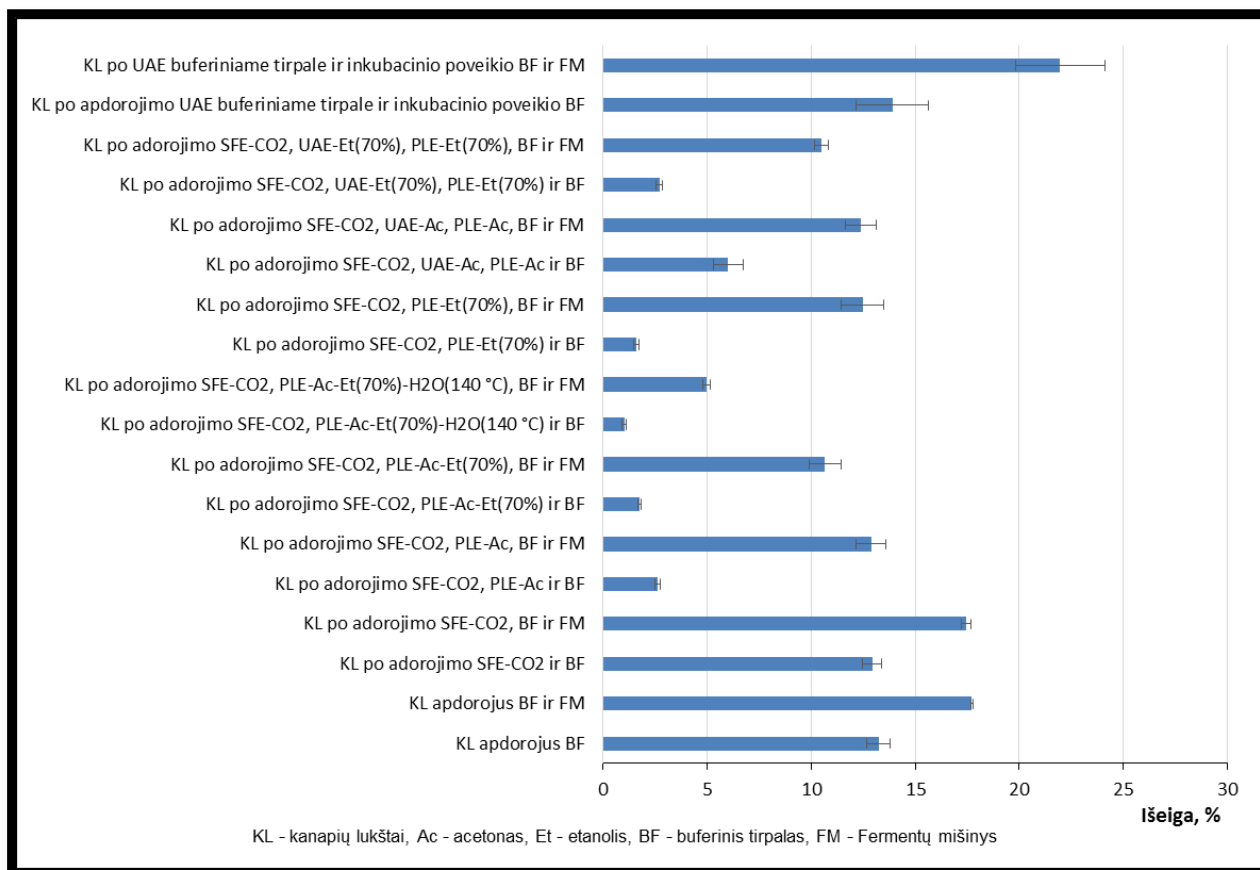
Antruoju ekstrahavimo etapu kanapių lukštai po apdoravimo SFE-CO₂ ekstrahuoti automatizuota suspausto skysčio ekstrakcijos (PLE) sistema, naudojant acetoną ir 70 % etanolį. Iš pradžių pasirinktas naudoti acetonas, kaip mažiausiai poliškiausias tirpiklis sekantis po superkritinio anglies dvideginio. Ektrakto išeiga siekia 5,52±0,48 %. Antru atveju, ekstrahuojant PLE sistema, naudotas 70 % etanolis, kurio ekstrakto išeiga – 6,14±0,46 %. Remiantis gautais rezultatais galima teigti, kad kanapių lukštuose po SFE-CO₂ polinių junginių kiekis didėja, nes naudojant 70 % etanolį gauta 11,21 % didesnė ekstraktų išeiga.

Trečiuoju etapu buvo siekiama įvertinti netiesioginės ultragarso ekstrakcijos (UAE) įtaką SFE-CO₂ apdorotai žaliavai, kuomet acetonas ir 70 % etanolis iš pradžių naudotas UAE procese, o po to PLE su tais pačiais tirpikliais. Ekstrakcijos išeiga po UAE acetonu ir PLE acetonu siekia 6,16±0,44 %, o po ekstrakcijos UAE 70 % etanoliu ir PLE 70 % etanoliu, išeiga siekia 7,52±0,58 %. Šie rezultatai parodo, kad papildomas apdorojimas netiesioginiu UAE acetonu ir PLE acetonu 11,56 % padidina ekstraktų išeigą, lyginant su apdoravimu tik PLE acetonu. Atitinkamai 22,50 % padidėjo ekstraktų išeigos po apdoravimo 70 % etanoliu. Taip pat po apdoravimo netiesioginiu UAE ir PLE yra pastebimas 22,11 % didesnis polinių junginių išekstrahavimas, t. y. netgi dvigubai didesnis už ekstrahavimą tik PLE sistema.

Ketvirtuoju etapu kanapių sėklų lukštai po apdoravimo SFE-CO₂ buvo ekstrahuoti PLE automatizuota sistema pakopiškai naudojant skirtingo poliškumo tirpiklius didėjančio poliškumo tvarka: acetonas, 70 % etanolis, vanduo (140 °C). Atitinkamai gautos ekstraktų išeigos: su acetonu – 5,52±0,48 %, 70 % etanoliu – 2,01±0,11 %, vandeniui (140 °C) – 5,03±0,08 %. Suminė visų PLE ekstraktų išeiga – 12,55±0,41 %. Pakopiškai ekstrahuojant SFE-CO₂ apdorotus kanapių sėklų lukštus PLE acetonu, 70 % etanoliu ir vandeniui (140 °C), gauta 43,47 % didesnė išeiga, lyginant su SFE-CO₂ ekstrakto išeiga. Suminė SFE-CO₂ ir pakopinės PLE acetonu, 70 % etanoliu ir vandeniui (140 °C) ekstrakcijos išeiga siekia – 21,30 %. Tai yra efektyviausias technologinė procesas siekiant išgauti didžiausią kiekį bioaktyvių medžiagų.

3.3 Optimalių fermentavimo sąlygų pritaikymas kanapių lukštų mėginiams apdorotiems skirtingais ekstrakcijos metodais

Niekuo neapdoroti ir apdoroti skirtingais ekstrakcijos procesais (SFE-CO₂, PLE, UAE) kanapių sėklų lukštai buvo papildomai fermentuoti optimaliomis sąlygomis (E/S=6,7, pH=4,54, inkubacijos laikas – 6 val ir 12 min, temperatūra – 50 °C, orbitalinės maišyklės greitis – 250 aps/min) Viscozyme L fermentų mišiniu ir ekstrahuoti 50 mmol/L natrio citratinu buferiniu tirpalu tomis pačiomis sąlygomis, kaip ir fermentacijos, siekiant išsiaiškinti fermentacijos įtaką atpalaiduojant bioaktyvius junginius iš lignoceliuliozinės žaliavos. Po fermentacijų gauti bioaktyvių junginių tirpalai liofilizuoti ir iš jų suskaičiuotos atpalaiduotų junginių išeigos, kurios pateiktos 3.6 paveiksle.



3.6 paveikslas. Bioaktyvių junginių išeigos po fermentavimo proceso.

Pirmoji fermentacija ir ekstrakcija buferiniu tirpalu buvo atlikta naudojant nieko neapdorotus kanapių sėklų lukštus, kurių išeigos siekė $17,73 \pm 0,07$ % ir $13,24 \pm 0,56$ %. Šie rezultatai parodo, kad komercinių fermentų Viscozyme L mišinys 33,91 % daugiau padeda atpalaiduoti lignoceliuliozinėje matricoje įsiterpusius junginius. Antru etapu fermentacijai ir ekstrakcijai buferiniu tirpalu atlikti buvo naudota kanapių sėklų lukštų biomasė po apdoravimo SFE-CO₂. Gauti rezultatai praktiškai nesiskyrė nuo gautų pirmuoju etapu. Išeigos po apdoravimo

fermentų mišiniu – $17,45 \pm 0,45$ % ir po apdoravimo buferiniu tirpalu – $12,93 \pm 0,45$ %. Fermentų pagalba pavyko 34,95 % daugiau išgauti tirpių junginių. Lyginant pirmuoju ir antruoju etapu gautus rezultatus, galima pasakyti, kad kanapių sėklų lukštų biomasė turi pakankamai daug lengvai atpalaiduojamų tirpių nepolinių ir polinių junginių. Tai gerai atsispindi išėigų vertėse gautose tiesiog inkubuojant biomasę buferiniame tirpale.

Trečiuoju etapu buvo atlikta fermentacija ir ekstrakcija buferiniu tirpalu naudojant kanapių sėklų lukštus po apdoravimo SFE-CO₂ ir PLE acetonu. Fermentacijos išėiga siekė – $12,88 \pm 0,73$ %, o ekstrakcijos buferiniu tirpalu – $2,61 \pm 0,12$ %. Šiuo atveju matyti, kad didžioji dalis lengvai prieinamų bioaktyvių junginių buvo išekstrahuota SFE-CO₂ proceso metu, o sunkiau prieinami junginiai atpalaiduoti hidrolizuojant lignoceliuliozinę matricą. Tirpių junginių kiekis padidėjo net 5 kartus lyginant su nefermentuotu mėginiu.

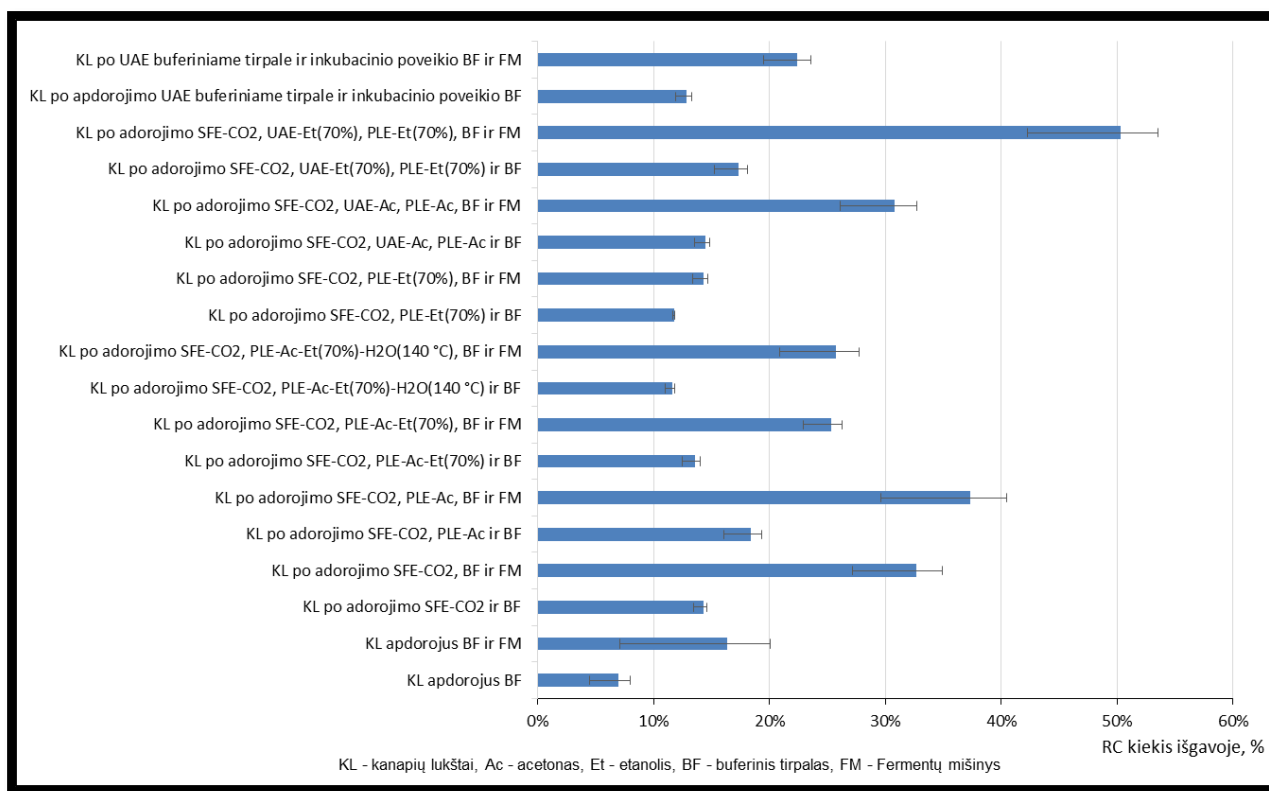
Ketvirtuoju etapu, kuomet buvo atliekama fermentacija ir ekstrakcija su žaliava po apdoravimo SFE-CO₂ ir PLE 70 % etanoliu, gauti panašūs fermentavimo rezultatai, kaip ir trečiuoju atveju. Išėigos atitinkamai siekė $12,38 \pm 0,74$ % ir $1,59 \pm 0,11$ %. Fermentų mišinio įtaka lėmė beveik aštuonis kartus didesnę kiekį susidariusių tirpių junginių lyginant su ekstrakcija buferiniu tirpalu.

Penktuoju etapu atlikta fermentacija ir ekstrakcija buferiniu tirpalu su kanapių sėklų lukštais, kurie buvo apdoroti SFE-CO₂ ir automatizuota PLE sistema, pakopiškai ekstrahuojant didėjančio poliškumo tirpikliais: acetonu, 70 % etanoliu, vandeniui (140 °C). Fermentacija ir ekstrakcija buferiniu tirpalu su žaliava, kuri buvo apdorota SFE-CO₂ ir acetonu, paminėta trečiame etape. Biomasės, kuri buvo apdorota SFE-CO₂ ir PLE acetonu bei 70 % etanoliu, fermentavimo metu susidarę tirpūs junginiai sudarė $10,67 \pm 0,79$ %, o ekstrahavimo buferiniu tirpalu metu – $1,74 \pm 0,09$ %. Fermentacija įtakojo daugiau negu 6 kartus didesnę bioaktyvių medžiagų išsiskyrimą. Fermentacijos, kuriai buvo panaudota kanapių sėklų luobelė žaliava, apdorota SFE-CO₂ ir PLE acetonu, 70 % etanoliu, vandeniui (140 °C), išėiga smarkiai sumažėjo ir siekė $4,96 \pm 0,17$ %, o ekstrakcijos buferiniu tirpalu išėiga siekė $1,01 \pm 0,10$ %. Šiuo atveju taipogi galima matyti absoliučią fermentavimo proceso naudą bioaktyvių junginių išėigimui, kuris beveik 5 kartus padidina junginių išėigą lyginant su ekstrakcija buferiniu tirpalu.

Šeštuoju etapu buvo norima įvertinti UAE ekstrakcijos bei fermentavimo proceso kombinacijos efektyvumą. Iš pradžių buvo naudota niekuo neapdorota kanapių sėklų lukštų biomasė ją veikiant netiesiogine UAE buferiniame tirpale ir po to apdorojant biomasę fermentavimo metu ir tiesiog tolimesniu buferinio tirpalo poveikiu. Kanapių sėklų lukštų po apdoravimo UAE buferiniame tirpale ir fermentų mišiniu išėiga siekė – $21,98 \pm 2,13$ %, o po apdoravimo UAE buferiniame tirpale ir tolimesnės ekstrakcijos buferiniu tirpalu – $13,92 \pm 1,74$ %. Kanapių sėklų lukštų ekstrahavimas buferiniame tirpale ir fermentavimas fermentų mišiniu

padidino ekstrakcijos išėigą 19,17 % lyginant su pirmame etape atliktu fermentavimu. Ekstrakcija buferiniu tirpalu šiuo atveju lyginant su išėiga gauta pirmame etape didelės įtakos neturėjo, t. y. išėiga padidėjo tik 5 %. Kanapių sėklų lukštų biomasė, kuri buvo apdorota SFE-CO₂, ekstrahuota UAE acetone ir PLE acetonu. Atitinkamai gautos išėigos 12,38±0,74 % ir 6,00±0,71 %. Tokiomis pačiomis sąlygomis apdorota biomasė vietoj acetono naudojant 70 % etanolį. Fermentavimo išėigos siekė 10,51±0,34 %, o ekstrahavimo buferiniu tirpalu – 2,69±0,14 %. Iš gautų rezultatų galima teigti, jog UAE acetonu geriau sąveikauja su kanapių sėklų lukštų biomasė, nes tiek fermentavimo metu, tiek ekstrahavimo buferiniu tirpalu metu, gautos didesnės išėigos. Fermentavimo proceso – 17,79 %, o ekstrahavimo buferiniu tirpalu išėiga buvo didesnė daugiau negu 2 kartus.

Po fermentacijų ir ekstrakcijų buferiniu tirpalu skystųjų frakcijų liofilizuoti bandiniai buvo panaudoti redukuojančių cukrų (RC) procentiniam kiekiui gautose išėigose suskaičiuoti. RC nustatyti atliekant spalvines reakcijas DNS metodu. Rezultatai pateikti grafiškai 3.7 paveiksle.



3.7 paveikslas. Redukuotų cukrų kiekis tirpių medžiagų išėigose.

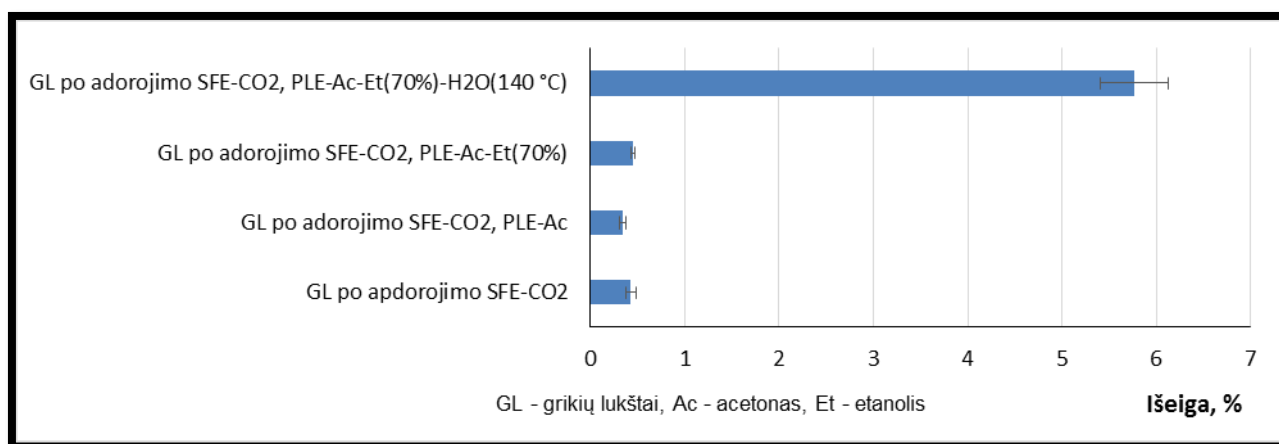
Iš rezultatų puikiai matyti, kad redukuojančių cukrų kiekis visų fermentuotų žaliavų skystojoje išėigoje yra beveik dvigubai didesnis lyginant su ta pačia biomasė, tik paveikta ekstrakcijos buferiniu tirpalu. Taipogi, susidariusių redukuojančių cukrų kiekis mėginiuose atspindi, kad Viscozyme L fermentų mišinys buvo aktyviausias, kuomet medžiaga buvo apdorojama po kombinuotų SFE-CO₂, PLE ir UAE ekstrakcijų lyginant su žaliava, kuri niekuo

nebuvo apdorota prieš fermentacijos procesą. Galima daryti išvadą, kad papildomi biomasės apdorėjimai įvairiais ekstrakcijos metodais, padeda fermentų mišiniui lengviau pasiekti celiuliozinę kanapių sėklų luobelės sandaros dalį ir efektyviau hidrolizuoti karbohidratinis ryšius.

3.4 Optimalių fermentavimo sąlygų pritaikymas įvairiais ekstrakcijos metodais apdorotai grikių sėklų lukštų biomasei

Grikių lukštai susmulkinti sietiniu malūnu iki ne didesnių, kaip 0,5 mm dalelių. Susmulkinta grikių lukštų biomase (niekuo neapdorota ir apdorota skirtingais ekstrakcijos metodais) buvo panaudota atlikti fermentavimą, pritaikant optimalias sąlygas, kurios buvo gautos atlikus fermentuojant kanapių sėklų lukštus su Viscozyme L fermentų mišiniu pagal sudarytą CKRP.

Pirmuoju etapu buvo atliktas žaliavinių grikių lukštų apdorėjimas SFE-CO₂. Buvo gauta labai maža išeiga – 0,43±0,06 %. Po to sekė pakopinis ekstrahavimas PLE acetonu, 70 % etanolu ir vandeniu (140 °C). Atitinkamai gautos išeigos: 0,34±0,03 %, 0,45±0,02 %, 5,77±0,36 %. Ekstrakcijų išeigų rezultatai grafiškai pavaizduoti 3.8 paveiksle.

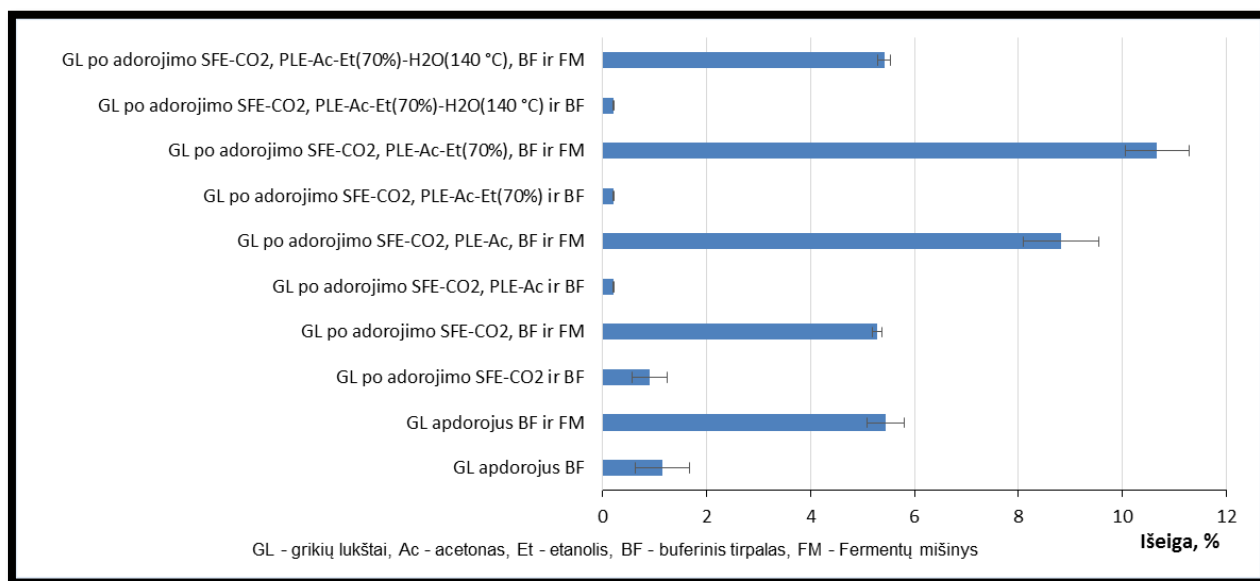


3.8 paveikslas. Ekstraktų mišinių išeigos iš grikių lukštų po skirtingų ekstrakcijos metodų pritaikymo.

Iš ekstrakcijos rezultatų galima teigti, jog daugiausia grikių lukštų luobelėse yra polinių junginių. Tai atspindi net daugiau negu 10 kartų gauta didesnė tirpių junginių išeiga ekstrahuojant PLE vandeniu (140 °C), negu PLE acetonu ar 70 % etanolu.

Antru etapu buvo atlikti fermentavimo procesai optimaliomis sąlygomis (žr. 3.9 pav.) su žaliaviniais ir skirtingais ekstrakcijos metodais apdorota grikių lukštų biomase. Mėginiai su substratu ir buferiniu tirpalu be fermento mišinio buvo naudoti kaip kontrolės sekti fermentavimo efektyvumui. Iš pradžių atliktas fermentavimas su niekuo neapdorotais grikių lukštais. Gauta daugiau negu 10 kartų didesnė tirpių junginių išeiga lyginant su ekstraktų išeigomis po SFE-CO₂,

PLE acetonu ar 70 % etanoliu. Mėginio su fermentų mišiniu išeiga siekė $5,44 \pm 0,36$ %, o kontrolinio mėginio $1,15 \pm 0,52$ %. Taip pat buvo atliktas fermentavimas su SFE-CO₂ apdorotais



3.9 paveikslas. Bioaktyvių junginių išeigos iš grikių lukštų po fermentavimo proceso.

grikių lukštais. Išeigų rezultatai gauti labai panašūs, kaip ir su niekuo neapdorotais lukštais, t. y. $5,28 \pm 0,10$ % (su fermentų mišiniu) ir $0,9 \pm 0,34$ % (kontrolinio mėginio). Be to, buvo atliktas fermentavimas su žaliavomis, gautomis po pakopinės PLE ekstrakcijos acetonu, 70 % etanoliu ir vandeniui (140 °C). Atitinkamai gauti išeigų rezultatai: $8,82 \pm 0,72$ %, $10,67 \pm 0,61$ %, $5,42 \pm 0,12$ %. Kontrolinių bandinių išeigos neviršijo 0,2 %. Šie išeigų rezultatai puikiai atspindi, kad bioaktyvių junginių atpalaidavimui iš neapdorotos ir po įvairiais ekstrakcijos metodais apdorotos grikių lukštų biomasės, geriausiai tinka fermentavimas, kuris ypatingai padidina tirpių junginių susidarymą.

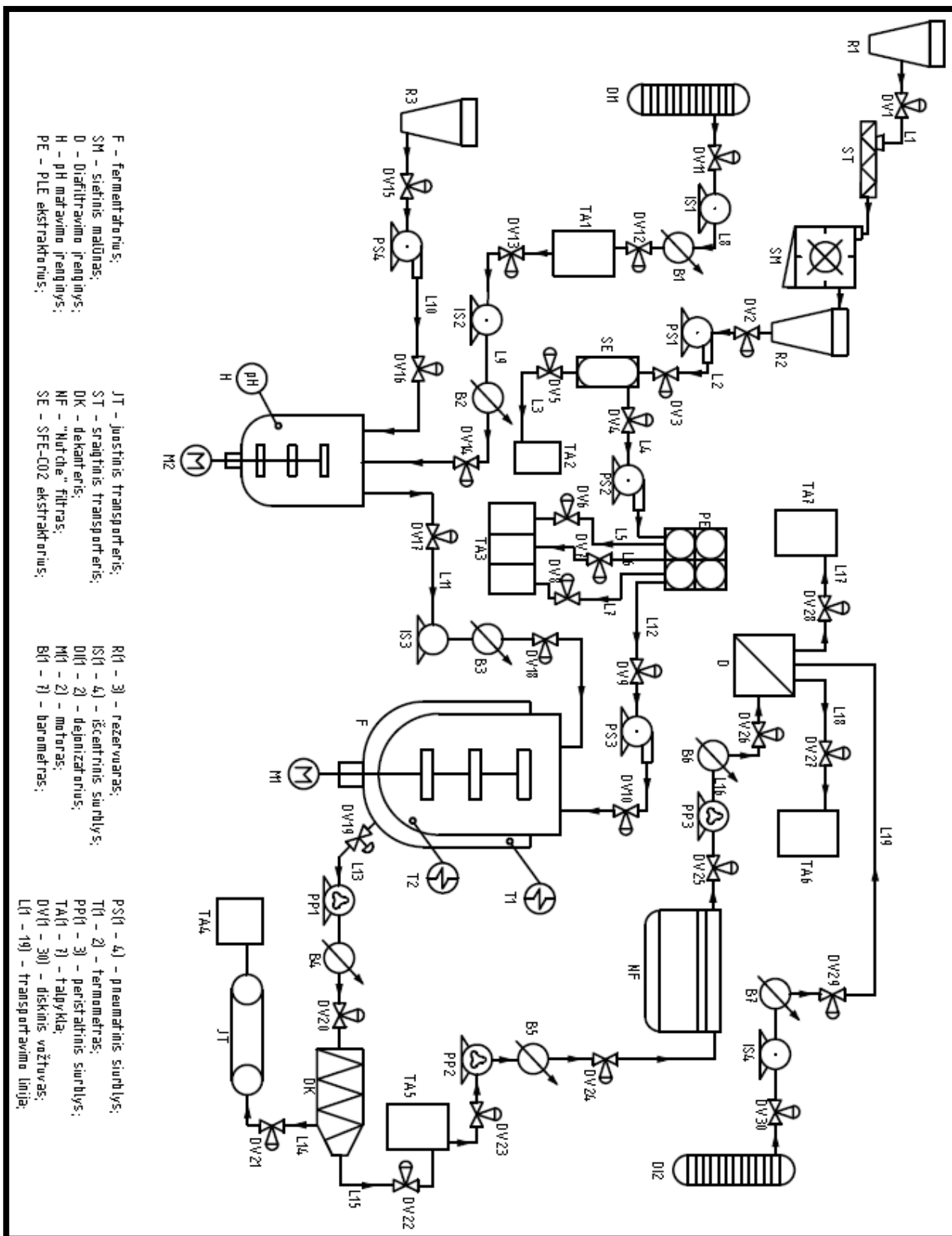
4. Rekomendacijos

4.1 Efektyviausio bioaktyvių junginių išgavimo proceso iš kanapių sėklų lukštų aparatūrinė schema

Didžiausia bioaktyvių junginių išėiga iš kanapių sėklų lukštų pasiekta naudojant technologinį procesą, kurio metu žaliaviniai kanapių lukštai apdoroti SFE-CO₂ ir PLE (acetonu, 70 % etanoliu, 140 °C vandeniui) ir fermentine hidrolize. Aparatūrinė schema pavaizduota 5.1 paveiksle.

Technologinis procesas prasideda atidarius sklendę DV1 ir įjungus sraigtinį transporterį ST, kuris iš rezervuaro R1 per liniją L1 į sietinį malūną SM transportuoja kanapių lukštus. Kanapių lukštai susmulkinami iki ne didesnių negu 0,5 mm diametro dalelių esant 10000 aps/min sukimosi greičiui. Smulkinami lukštai nepertraukiamai patenka į rezervuarą R2. Atidarius sklendes DV2 ir DV3 per liniją L2 iš rezervuaro R2 susmulkinti kanapių lukštai transportuojami pneumatiniu siurbliu PS1 į SFE-CO₂ ekstraktorių, kuriame esant 60 °C temperatūrai ir 55 MPa slėgiui superkritiniu CO₂ ekstrahuojama biomasė naudojant 30 min statinę ir 180 min dinaminę ekstrakciją. Atidarius sklendę DV5 ekstraktas surenkamas per liniją L3 į talpą TA2. Po ekstrahavimo SFE-CO₂ apdorota biomasė linija L4 ir atidarius sklendę DV4 transportuojama pneumatiniu siurbliu PS2 į PLE ekstraktorių, kuriame atliekamas ekstrahavimas išlaikant 10,3 MPa slėgį ir darbinę 70 °C temperatūrą ekstrakcijai acetonu, 70 % etanoliu bei darbinę 140 °C ekstrakcijai vandeniui. Ekstraktai iš PLE sistemos transportuojami trijų skyrių talpą TA3. Linija L5 ir atidarius sklendę DV6 teka ekstraktas, gautas po ekstrakcijos acetonu, o linija L5 ir atidarius DV7 transportuojamas ekstraktas, gautas po ekstrakcijos 70 % etanoliu. Atinkamai ekstraktas, gautas po ekstrakcijos 140 °C vandeniui surenkamas per liniją L7 atidarius sklendę DV8 į 3 skyrių talpą TA3. Apdorotos PLE ekstraktoriais kanapių sėklų lukštų dalelės transportuojamos pneumatiniu siurbliu PS3 į fermentatorių F per L12 liniją atidarius sklendes DV9 ir DV10.

Dinatrio citrato ir mononatrio citrato druskų mišinys, kurį ištirpinus atitinkamame kiekyje vandens gaunamas 50 mmol/L koncentracijos ir 4,54 pH buferinis tirpalas, transportuojamas pneumatiniu siurbliu PS4 atidarius sklendes DV15 ir DV16 per liniją L10 į uždarą maišyklę MA. Iš dejonizatoriaus DI1 atidarius sklendes DV11 ir DV12 išcentrinis siurbliu IS1 transportuojamas dejonizuotas vanduo į talpą TA1. Barometru B1 sekamas vamzdynuose tekančio vandens slėgis. Iš talpos TA1 išcentrinis siurbliu IS2 transportuojamas dejonizuotas vanduo, kuris atidarius sklendes DV13 ir DV14 teka į maišyklę MA, kurioje varikliui M2 perduodant sukimo judesį į maišyklės rotorius yra užtikrinamas greitesnis citratinių druskų



5.1 paveikslas. Efektyviausio bioaktyvių junginių išgavimo proceso iš kanapių sėklų lukštų aparatūrinė schema.

citratinių druskų tirpinimas. Barometru B2 sekamas vamzdynuose tekančio vandens slėgis. pH maišyklėje MA užtikrinamas pH matavimo elektrodu H. Pagamintas buferinis tirpalas iš talpos MA išcentrinio siurbliu IS3 atidarius sklendes DV17 ir DV18 transportuojamas per liniją L11 į

fermentatorių F. Barometru B3 sekamas vamzdynuose tekančio buferinio tirpalo slėgis. Fermentavimo metu fermentatoriuje F termometrais T1 ir T2 užtikrinama 50 °C temperatūra. Motoro M1 sukuriama sukamasis judesys, kuris yra perduodamas į fermentatoriaus rotorius F siekiant užtikrinti spartesnius šilumos mainus ir aktyvesnes chemines reakcijas.

Užbaigus fermentavimo procesą ir atidarius sklendes DV19 ir DV20 per liniją L13 peristaltiniu siurbliu PP1 transportuojamas kanapių sėklų lukštų hidrolizatas į dekanterį DK, kuriame atskiriamos kietoji ir skystoji fazės. Barometru B4 stebimas vamzdynuose susidaręs slėgis. Atidarius sklendę DV21 per liniją L14 kietoji frakcija transportuojama juostinio transporterio JT į surinkimo talpą TA4. Skystoji frakcija tiekama į talpą TA5 per liniją L15, atidarius sklendę DV22. Iš talpos TA5, atidarius sklendes DV23 ir DV24, skystoji frakcija transportuojama peristaltiniu siurbliu PP2 į „Nutsche“ filtravimo sistemą. Barometru B5 stebimas sistemoje susidarantis slėgis. Iš „Nutsche“ filtravimo sistemos dar kartą perfiltruota, skaidri skystoji frakcija transportuojama per liniją L16 į Diafiltravimo įrenginį D atskirti skystojoje frakcijoje esančias druskas. Skystoji frakcija tiekama peristaltiniu siurbliu PP3 į diafiltravimo įrenginį atidarius sklendes DV25 ir DV26. Barometru B6 stebimas sistemoje susidarantis slėgis.

Atidarius sklendes DV29 ir DV30 dejonizuotas vanduo tiekiamas išcentrinu siurbliu IS4 į diafiltravimo įrangą D per liniją L19. Barometras B7 naudojamas stebėti tiekiamo vandens slėgį. Iš diafiltravimo įrangos, atidarius sklendę DV27 į talpą TA6 per liniją L18 surenkamos atliekos, o į talpą TA7, atidarius sklendę DV28, per liniją L17 surenkamas galutinis produktas.

5. Išvados

- Nustatytos optimalios kanapių sėklų luobelėlių ($d \leq 0,5$ mm) fermentavimo sąlygos: pH=4,54, E/S=6,7, ekspozicijos trukmė – 6 val ir 12 min visada išlaikant 50 °C temperatūrą ir 250 aps/min greitį.
- Optimalios fermentavimo sąlygos pritaikytos niekuo neapdorotai ir įvairiomis ekstrakcijų (SFE-CO₂, PLE, UAE) kombinacijomis apdorotai kanapių sėklų luobelėlių biomasei. Nustatyta, kad fermentacijos procesas su žaliava, kuri buvo apdorota SFE-CO₂ ir PLE (acetonu, 70 % etanoliu arba 140 °C vandeniui), padidina nuo 5 iki 8 kartų bioaktyvių junginių išėigą lyginant su ta pačia žaliava, kuri buvo tik inkubuota 50 mmol/L natrio citratiniame buferiniame tirpale išlaikant tas pačias fermentacijos metu taikomas aplinkos sąlygas. Be to, nustatyta, kad fermentacija naudojant žaliavą po ekstrakcijos UAE (acetonu), PLE (acetonu) ir UAE (70 % etanoliu), PLE (70 % etanoliu) atitinkamai padidina bioaktyvių junginių išėigą nuo 2 iki 4 kartų lyginant su ta pačia žaliava inkubuota buferiniame tirpale.
- Išmatuotos redukuojančių cukrų koncentracijos skystosiose fazėse, gautose po įvairiais ekstrakcijos metodais apdorotų kanapių lukštų fermentavimo procesų, ir apskaičiuoti RC procentiniai kiekiai išėigose.
- Darbe nustatytos optimalios fermentavimo sąlygos pritaikytos bioaktyvių junginių išėigimui iš grikių lukštų biomasės. Gauti išėigų rezultatai fermentavimo metu buvo daugiau negu dešimt kartų didesni lyginant su išėigų rezultatais, gautais po ekstrakcijų SFE-CO₂, PLE acetonu ar 70 % etanoliu.
- Sudaryta rekomenduojama efektyviausio bioaktyvių junginių išėigimo iš kanapių sėklų lukštų technologinio proceso gamybinė aparatūrinė schema.

6. Literatūros sąrašas.

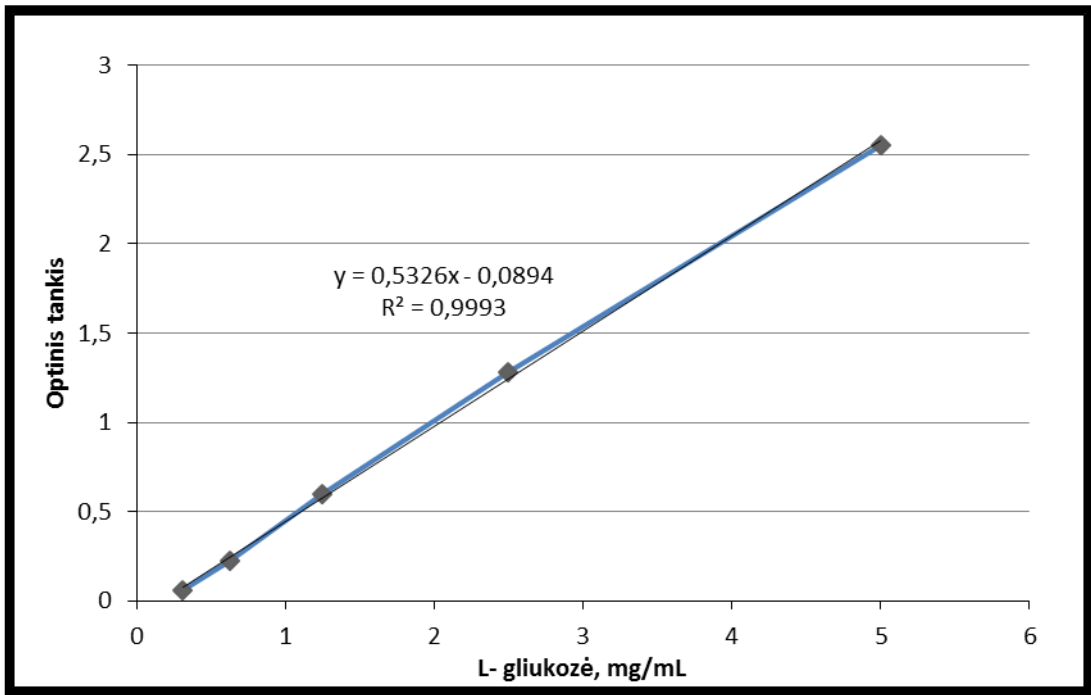
1. FARAG, S., KAYSER, O., Cultivation and Breeding of Cannabis sativa L. for Preparation of standardized Extracts for Medicinal Purposes, Medicinal and Aromatic Plants of the World, Scientific, Production, Commercial and Utilization Aspects, 3. Technische Biochemie, Fakultät Bio- und Chemieingenieurwesen, Technische Universität Dortmund, Emil-Figge-Str.66, 44227, Dortmund, Germany, 1, 2015, 165-186, ISBN 978-94-017-9809-9.
2. FIKE, J., Industrial Hemp: Renewed Opportunities for an Ancient Crop, Critical Reviews In Plant Sciences, Department of Crop and Soil Environmental Sciences, College of Agriculture and Life Sciences, Virginia Tech, Blacksburg, Virginia, USA, 2017, 1549-7836, ISSN: 0735-2689.
3. AIZPURUA-OLAIZOLA, O. et al., Evolution of the Cannabinoid and Terpene Content during the Growth of Cannabis sativa Plants from Different Chemotypes, Journal of Natural Products, Analytical Chemistry Department, University of the Basque Country (UPV/EHU), Barrio Sarriena s/n, 48940 Leioa, Spain, 2016, 79 (2), 324–331.
4. PERTWEE, R., Handbook of Cannabis, Institute of Medical Sciences, University of Aberdeen, Great Clarendon Street, Oxford, United Kingdom, 2014, 115 – 157.
5. SHIN, S., SUNG, Y. J., Improving enzymatic hydrolysis of industrial hemp (Cannabis sativa L.) by electron beam irradiation, Radiation Physics and Chemistry, 2008, 77, 1034– 1038.
6. SHIN, S. Y. et al., Chemical Characterization of Industrial Hemp (Cannabis sativa) Biomass as Biorefinery Feedstock, Korean Journal of Plant Resources, 2008, 21 (3), 222-225.
7. BARTA, Z., OLIVA J. M. et al. Refining Hemp Hurds into Fermentable Sugars or Ethanol, Chemical and Biochemical Engineering Quarterly, 2010, 24 (3) 331–339.
8. MENON, V., RAO M., Trends in bioconversion of lignocellulose: Biofuels, platform chemicals and biorefinery concept, Progress in Energy and Combustion Science, 2012, 38, 522 – 550.
9. MENON, V. et al., Enzymatic hydrolysis and ethanol production using xyloglucanase and Debaromyces hansenii from tamarind kernel powder: galactoxyloglucan predominant hemicellulose, Journal of Biotechnology, 2010, 148(4), 233 – 239.
10. TAHERZADEH, M. J., Pretreatment of Lignocellulosic Wastes to Improve Ethanol and Biogas Production: A Review, International Journal of Molecular Sciences, 9, 2008, 1621-1651, ISSN 1422-0067.

11. KOS, T. et al., Fast preparation of nanocrystalline cellulose by microwave-assisted hydrolysis, *Cellulose*, 21(4), 2014, 2579-2585.
12. HASUNUMA, T. et al., A review of enzymes and microbes for lignocellulosic biorefinery and the possibility of their application to consolidated bioprocessing technology, *Bioresource Technology*, 135, 2013, 513 – 522,
13. ROSTAGNO, M. A., PRADO, J. M., *Natural Product Extraction Principles and Applications*, RSC Green Chemistry, 21, Royal Society of Chemistry, 2013, Thomas Graham House, Science Park, Milton Road, Cambridge CB4 0WF, United Kingdom, 2013, ISBN 978-1-84973-606-0.
14. HU, Z., HUANG, F., Pretreatment Methods for Bioethanol Production, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 174(1), 2014, 43 – 62.
15. LEVASSEUR, A. et al., Expansion of the enzymatic repertoire of the CAZy database to integrate auxiliary redox enzymes, *Biotechnology for Biofuels*, 6(41), 2013, 1 – 14.
16. KUGLARZ, M., et al., Integrated production of cellulosic bioethanol and succinic acid from industrial hemp in a biorefinery concept, *Bioresource Technology* 200, 2016, 639 – 647.
17. PAKARINEN, A., Enzymatic accessibility of fiber hemp is enhanced by enzymatic or chemical removal of pectin, *Bioresource Technology*, 107, 2012, 275 – 281.
18. GAMA, R., DYK, S. V., PLETSCHE, B., I., Optimisation of enzymatic hydrolysis of apple pomace for production of biofuel and biorefinery chemicals using commercial enzymes, *3 Biotech*, 5(6), 1075 – 1087.
19. STANBURY, P. F., WHITAKER A., HALL, S. J., *Principles of Fermentation Technology*, Elsevier Science Ltd., The Boulevard. Langford Lane, Kidlington, Oxford OX5 1GB, United Kingdom, 1995, 90, ISBN 0-08-036131-5.
20. McCLEARY, B., V., McGEOUGH, P., A Comparison of Polysaccharide Substrates and Reducing Sugar Methods for the Measurement of endo-1,4- β -Xylanase, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 177, 2015, 1152 – 1163.
21. GHOSE, T. K. et al., Measurement Of Cellulase Activities, *Pure & Applied Chemistry*, 59(2), 1987, 257 – 268.
22. DARANI, K. K., MOZAFARI, M. R., Supercritical fluids technology in bioprocess industries: A review, *Journal of Biochemical Technology*, 2(1), 2010, 144 – 152.
23. PEREIRA, C. G., *Supercritical Fluid Extraction of Bioactive Compounds: Fundamentals, Applications and Economic Perspectives*, *Food Bioprocess Technology*, 3, 2009, 340–372.

24. SHARIF, K. M. et al., Experimental design of supercritical fluid extraction – A review, *Journal of Food Engineering*, 124, 2014, 105 – 116.
25. PILAR SANCHEZ-CAMARGO, A. et al, On-line coupling of supercritical fluid extraction and chromatographic techniques, *Journal of Separation Science*, 40, 2017, 213 – 227.
26. MUSTAFA, A., TURNER, C., Pressurized liquid extraction as a green approach in food and herbal plants extraction: A review, *Analytica Chimica Acta*, 703, 2011, 8 – 18.
27. HENNION M. C., Solid-phase extraction: method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, 856, 1999, 3 – 54.
28. POVILAITIS, D., VENSKUTONIS, P. R., Optimization of supercritical carbon dioxide extraction of rye bran using response surface methodology and evaluation of extract properties, *Journal of Supercritical Fluids*, 100, 2015, 194 – 200.
29. PURI, M., SHARMA, D., BARROW, C. J., Enzyme-assisted extraction of bioactives from plants, *Trends in Biotechnology*, 30 (1), 2012, 37 – 44.
30. SAHA, B. C., Dilute Acid Pretreatment, Enzymatic Saccharification And Fermentation Of Wheat Straw To Ethanol, *Process Biochemistry*, 40, 2005, 3693–3700.
31. GUAN, X., YAO, H., Optimization of Viscozyme L-assisted extraction of oat bran protein using response surface methodology, *Food Chemistry*, 106, 2008, 345–351.
32. MEHANNI, A. el S., et al, Enzymatic Extraction Of Oil From *Balanites Aegyptiaca* (Desert Date) Kernel And Comparison With Solvent Extracted Oil, *Journal of Food Biochemistry*, 00, 2016, 1 – 6.

7. Priedai

1 priedas



Kalibracinė kreivė reduktuotų cukrų analizei DNS metodu.

2 priedas

Biorefining of buckwheat (*Fagopyrum esculentum*) hulls 1 by using supercritical fluid, pressurized liquid and enzyme-assisted extraction methods

Ignas Mackêla, Tomas Andriekus, Petras Rimantas Venskutonis*

Department of Food Science and Technology, Kaunas University of Technology, Radvilënu pl. 19, Kaunas, LT-50254, Lithuania,

*corresponding author: rimas.venskutonis@ktu.lt

Abstract

Dehulling of buckwheat seeds produces high amounts of processing by-product, the hulls. Soxhlet, supercritical carbon dioxide (SFE-CO₂), pressurized liquid (PLE) and enzyme assisted (EAE) extraction schemes were applied for the hulls for their biorefining into higher added value soluble 16 fractions. The highest total yield in Soxhlet extraction using hexane, acetone and methanol was 17 5.2%, while at optimal SFE-CO₂ parameters (55 MPa, 60 °C, 90 min) 1.47 % of lipophilic constituents were isolated. Addition of 5% co-solvent ethanol in SFE-CO₂ increased the yield to 1.86%. Extract yields were highly dependent on powder particle size. Fractionation process was continued by applying PLE and EAE using ‘green’ solvents, ethanol ant water and commercial xylanolytic enzyme preparation Viacozyme L. These methods enabled to remarkably increase (4-5- fold) the yields of soluble fractions. The extracts and residues of extractions were evaluated using antioxidant activity and total phenolic content assays. The study shows that buckwheat hulls may be biorefined into high antioxidant capacity and other functional ingredients, which may find various applications, primarily in foods and nutraceuticals.

Keywords: buckwheat hulls; supercritical fluid extraction; pressurized liquid extraction; enzyme assisted extraction; antioxidant capacity

Padėkos

Dėkoju prof. dr. Rimantui Petrui Venskutoniui už suteiktą galimybę dalyvauti moksliniame projekte ir vertingus patarimus atliekant tiriamąjį darbą. Taipogi dėkoju projekte dirbusiems dr. Vaidai Kitrytei, dr. Dariui Povilaičiui ir ATA dr. Rokui Gendvilui už pagalbą ir patarimus įgyvendinant projekte išsikeltus uždavinius.